

厚生労働科学研究 研究費補助金

**新型インフルエンザ等新興・再興感染症
研究事業**

**抗毒素の品質管理及び抗毒素を使用した
治療法に関する研究**

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 一二三 亨

平成26年(2014)3月

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

抗毒素の品質管理及び抗毒素を使用した治療法に関する研究班

平成 25 年度 研究組織

研究代表者

一 二 三 亨 香川大学医学部附属病院 救命救急センター

研究分担者

銀永明弘	一般財団法人 化学及血清療法研究所 第一製造部
堺 淳	(財)日本蛇族学術研究所 主任研究員
澤邊京子	国立感染症研究所昆虫医科学部 昆虫医科学部 部長
新井 智	国立感染症研究所 感染症疫学センター 主任研究官
阿戸 学	国立感染症研究所 免疫部 部長
柴山恵吾	国立感染症研究所 細菌第二部 部長
山本明彦	国立感染症研究所 細菌第二部 主任研究官

研究協力者

黒田泰弘	香川大学医学部附属病院・救命救急センター 教授
小井土雄一	(独)国立病院機構 災害医療センター救命救急科 部長
藤見 聡	大阪府立急性期・総合医療センター高度救命救急センターセンター長
岸川政信	福岡市民病院 救急科 科長
村川昌弘	貝塚病院 内科 部長
高橋元秀	(独)医薬品医療機器総合機構 品質管理部
山岸拓也	国立感染症研究所 感染症疫学センター 主任研究官
小林睦生	国立感染症研究所昆虫医科学部 昆虫医科学部
二瓶直子	国立感染症研究所昆虫医科学部 昆虫医科学部
渡辺 護	国立感染症研究所昆虫医科学部 昆虫医科学部
堀田 晶	一般財団法人 化学及血清療法研究所 ワクチン製造一部第二課長
堀川義兼	一般財団法人 化学及血清療法研究所 品質管理部 菊池品質管理室長
松村 隆之	国立感染症研究所 免疫部 主任研究官

Ⅰ．総括研究報告書

11 . 分担研究報告書

目 次

	頁
I. 総括研究報告書	
抗毒素の品質管理及び抗毒素を使用した治療法に関する研究	
研究代表者 一二三 亨	1
II. 分担研究報告書	
1. 抗毒素の品質管理及び抗毒素を使用した治療に関する研究	
銀永 明弘.....	28
2. 2000 年に試作したヤマカガシ抗毒素のヤマカガシ毒の血液凝固作用に 対する中和力価の測定	
堺 淳.....	31
3. セアカゴケグモの分布と咬傷の実態把握	
澤邊 京子.....	33
4. セアカゴケグモ咬傷患者発生状況の把握	
新井 智.....	42
5. ヤマカガシ及びセアカゴケグモ抗毒素の力価試験の開発	
阿戸 学.....	46
6. ヤマカガシ及びセアカゴケグモ抗毒素の力価試験、品質管理試験	
山本 明彦.....	50

厚生労働科学研究 研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

総括研究報告書

抗毒素の品質管理及び抗毒素を使用した治療法に関する研究

主任研究者 一二三 亨 香川大学医学部附属病院 救命救急センター

研究要旨： 2000年に厚生労働研究班によって作製されたヤマカガシ抗毒素とオーストラリアより研究班担当者が個人輸入したセアカゴケグモ抗毒素を用いて臨床研究を行い、実証的データを分析し、その安全性と有効性について検証した結果、以下の概要のとおりである。

1. ヤマカガシ抗毒素を用いた臨床研究については、まずヤマカガシ抗毒素の品質評価試験、力価測定を行い、さらにヤマカガシ抗毒素を使用した臨床研究を行うための倫理委員会承認、保険の加入を経て臨床研究を開始した。臨床研究開始後にはヤマカガシ抗毒素を用いた臨床研究の症例を蓄積し、さらに研究班発足前症例についてその病態生理や治療法について分析した。今後症例を蓄積していく予定である。

2. セアカゴケグモ抗毒素を用いた臨床研究については、セアカゴケグモ抗毒素を使用した臨床研究を行うための倫理委員会承認、保険の加入を経て臨床研究を開始した。しかし、初年度には、セアカゴケグモ抗毒素のオーストラリアからの輸入が困難な状況となったために、実態調査を重点的に施行した。昆虫情報処理研究会が提供する「ゴケグモ類の情報センター」を利用し、セアカゴケグモの生態と分布域に関する情報を集計し、さらに全国的な分布状況と咬傷事例を把握するため470医療機関を対象にアンケート調査を施行した。咬傷事

例の多い大阪・福岡の自治体，病院を重点的に調査し，
その臨床的特徴と抗毒素の保有状況を把握した。

研究分担者

銀永明弘	一般財団法人 化学及血清療法研究所 第一製造部
堺 淳	(財)日本蛇族学術研究所 主任研究員
澤邊京子	国立感染症研究所昆虫医科学部 昆虫医科学部 部長
新井 智	国立感染症研究所 感染症疫学センター 主任研究官
阿戸 学	国立感染症研究所 免疫部 部長
柴山恵吾	国立感染症研究所 細菌第二部 部長
山本明彦	国立感染症研究所 細菌第二部 主任研究官

研究協力者

黒田泰弘	香川大学医学部付属病院・救命救急センター 教授
小井土雄一	(独)国立病院機構 災害医療センター救命救急科 部長
藤見聡	大阪府立急性期・総合医療センター高度救命救急センターセンター長
岸川政信	福岡市民病院 救急科 科長
村川昌弘	貝塚病院 内科 部長
高橋元秀	(独)医薬品医療機器総合機構 品質管理部
山岸拓也	国立感染症研究所 感染症疫学センター 主任研究官
堀田 晶	(一財) 化学及血清療法研究所 ワクチン製造一部第二課長
堀川義兼	(一財) 化学及血清療法研究所品質管理部菊池品質管理室長
小林睦生	国立感染症研究所 昆虫医科学部 昆虫医科学部
二瓶直子	国立感染症研究所 昆虫医科学部 昆虫医科学部
渡辺 護	国立感染症研究所 昆虫医科学部 昆虫医科学部
松村 隆之	国立感染症研究所 免疫部 主任研究官

A . 研究目的

本臨床研究の目的は、2000年に厚生労働研究班によって作製されたヤマカガシ抗毒素とオーストラリアより研究班担当者が個人輸入したセアカゴケグモ抗毒素を用いて臨床研究を行い、実証的データを分析し、その安全性と有効性についての明らかにすることである。

国内におけるヤマカガシ、セアカゴケグモの咬傷例は少ないため、企業は収益性の問題等から抗毒素製剤の国内開発には消極的であり、現在の日本では承認薬として販売されている抗毒素は存在しない。ヤマカガシ、セアカゴケグモの咬傷は抗毒素を投与しないと重症化又は死亡する危険性があることから、抗毒素の存在は極めて重要である。

しかし、これらの抗毒素投与による有効性と安全性については、国内のデータが大変少ないために評価ができない状況である。さらに、抗毒素投与そのものによる副作用が生じた際の患者の救済環境は整っておらず、また抗毒素の安定供給のためのスキームもマニュアル化されていないのが現状である。

そこでそれぞれの咬傷受傷者を対象に抗毒素の投与を行い、その臨床的な有効性と副反応の種類や程度などのデータを収集する。被験者への投与の際、抗毒素の提供と同時に患者およびその家族に十分な説明を行って、同意書を作成した上に被験者にとって

不利益になるような副反応や傷害などの事象が起きた場合は臨床研究保険で補償する。

抗毒素製剤を使用した治療法の開発によって本邦におけるヤマカガシやセアカゴケグモの咬傷に対する安全で有効な投与法が確立し、国民の健康維持に有益な情報を提供できると推定される。

B . 研究方法

1. ヤマカガシ抗毒素を用いた臨床研究

まず、より効果的に臨床研究を開始するために既存の枠組みに研究班が加わり、より機能的にヤマカガシ抗毒素が患者のもとに供給される枠組みを作ることに重点を置いた(図1)。

主治医から蛇咬傷などで相談を受けた日本蛇族研究所堺研究員がヤマカガシ咬傷と判断し、ヤマカガシ抗毒素の投与が必要と判断した場合には研究班代表者一二三に連絡する。その時点で患者の状態と地理的条件を考慮し、災害医療センターないし香川大学救命センターに患者搬送が可能な場合には転院搬送する。不可能な場合や主治医が治療の継続を望む場合には、災害医療センターないし香川大学救命センター医師が遠隔処方し、日本蛇族研究所(群馬)ないし化学及び血清療法研究所(以下化血研とする)(熊本)から病院に抗毒素を搬送する。主治医は、本臨床研究を説明し、抗毒素使用承諾書を取得後に患者に抗毒素

を投与する。主治医は抗毒素使用登録書，治療報告書を一二三に送る。有害事象発生時には有害事象報告書を一二三まで送る。

臨床研究の開始にあたっては，抗毒素使用承諾書，抗毒素使用登録書，治療報告書，有害事象報告書（添付）を作成し，災害医療センター，香川大学救命センターの両倫理委員会での承認申請した（倫理委員会申請書，担当医説明書を添付）。

さらに，両倫理委員会承認後に臨床研究保険への加入を予定した。

2. ヤマカガシ抗毒素を用いた臨床研究を開始する以前の臨床データの把握と分析

日本蛇族研究所の記録を 2000 年 1 月 1 日から 2013 年 12 月 31 日まで後方視的に調査し，ヤマカガシ咬傷の臨床的特徴とその治療法について調査した。

3. ヤマカガシ抗毒素の力価試験、品質管理試験、安定性・安全性確認、血液凝固作用中和力価試験、血管内皮細胞傷害活性阻害試験

力価試験：マウス致死活性試験及びウサギ出血活性試験を用いたヤマカガシ抗毒素の中和試験。

安定性・安全性確認：現行の生物学的製剤基準の抗毒素に関する品質試験項目と共に，近年化血研にて自家検定に加えている試験項目を実施。

血液凝固作用中和力価試験：2000 年に製造したヤマカガシ毒と抗毒素を混合して 37 でインキュベートし、人正常血漿を加えて凝固時間を測定した。

血管内皮細胞傷害活性阻害試験：HMVEC-d 細胞 5,000 cells/100 μ L を培養後，ヤマカガシ試験毒素 (1,100 LD₅₀/mL)，または，対照としてハブ試験毒素出血 II (29,000 MHD/mL) とヤマカガシ毒素，ハブ毒素それぞれに対する希釈ウマ抗血清を混和して抗毒素の力価を測定。

4. セアカゴケグモ抗毒素を用いた臨床研究

セアカゴケグモ抗毒素はオーストラリア CSL 社から個人輸入し，臨床研究として使用する予定であった。しかし，CSL 社からの輸入が一時的に停止してしまっただけ抗毒素を輸入することができない状況となった。本研究班としては，いつ輸入再開しても直ちに臨床研究に移行できるために，ヤマカガシ抗毒素と同じ手続きを経ることとし，臨床研究の枠組みの構築（図 2）を行い，災害医療センター，香川大学救命センターの両倫理委員会での承認申請を行った。

さらに，両倫理委員会承認後に臨床研究保険への加入を予定した。

5. セアカゴケグモ咬傷患者数把握のための調査（アンケート調査を含む）

昆虫情報処理研究会が提供する「ゴケグモ類の情報センター」（<http://www.insbase.ac/xoops2/modules/bwiki/>）を利用し，セアカゴケグモの生態と分布域に関する情報を集計した。

さらに，クモ咬傷，セアカゴケグモ咬傷患者の有無を確認することを目的として，平成 26 年 1 月 31 日に感染症発生動向調査事業の 470 基幹定点医療機関（平成 25 年 10 月現在）を対象にアンケート調査を実施した。追加詳細アンケートを準備した（添付）。

6. セアカゴケグモ咬傷の詳細把握のために文献調査

大阪府立公衆衛生研究所奥野良信先生の報告を記載している大阪府のホームページ上 (<http://www.pref.osaka.jp/kankyo/eisei/seaka/>) では死亡率は3～12%と記載されている。この異常に高い死亡率に対して追跡調査が必要と判断し、施行した。またオーストラリア、米国の文献を中心に本邦の文献も含めて1950年までさかのぼり調査した。

7. セアカゴケグモ咬傷に対する自治体の対応を把握するための実地調査

セアカゴケグモ咬傷は全国一様ではなく、地域格差が大きい。ため、もっとも歴史のある大阪市・大阪府と2012年に2例の抗毒素使用症例を経験した福岡市を実地調査し、その対応について検討した。

C. 研究結果

1. ヤマカガシ抗毒素を用いた臨床研究

災害医療センター、香川大学救命センターの両倫理委員会での承認(添付)を得た後に臨床研究保険に加入した(添付)。

平成25年10月1日より臨床研究を開始した。本年度の該当症例は0症例であった。

2. ヤマカガシ抗毒素を用いた臨床研究を開始する以前の臨床データの把握と分析

2000年から2013年において、9症例の *R. tigrinus* 咬傷が特定された(8

名が男性、年齢の中央値:38歳)来院時のフィブリノーゲン値、血小板数、FDP値の中央値はそれぞれ50 mg/dL, 73,000 /mm³, 267 μg/mLであった。急性期DICスコアは8(1-8)点、中央値(最小値-最大値)であった。抗毒素は7症例に投与され、咬傷を負ってから抗毒素投与までに要した時間の中央値は35時間であった。院内死亡率は11%であり、抗毒素投与例では0%であった。

3. ヤマカガシ抗毒素の力価試験、品質管理試験、安定性・安全性確認、血液凝固作用中和力価試験、血管内皮細胞傷害活性阻害試験

力価試験:ヤマカガシ抗毒素のウサギ出血活性の中和活性測定による力価試験結果から、その経年変化が過小であることを確認した。

安定性・安全性確認:冷暗所に13年保存されたヤマカガシ馬抗毒素の品質試験の結果、製造直後の品質とほとんど変化を示さない成績であった。

血液凝固作用中和力価試験:1mlの抗毒素が1.369mg、1バイアル(10ml)が13.69mgのヤマカガシ毒を中和する結果となった。

血管内皮細胞傷害活性阻害試験:ハブ毒素に対する細胞傷害性は抗毒素の濃度依存的に阻害されたのに対し、ヤマカガシ毒素による細胞傷害性は、抗毒素によって阻害されなかった。

4. セアカゴケグモ抗毒素を用いた臨床研究

本年度中のセアカゴケグモ抗毒素の本邦への輸入は再開されなかった。しかし、災害医療センター、香川大学救命センターの両倫理委員会での承

認後に臨床研究保険へ加入した。

5. セアカゴケグモ咬傷患者数把握のための調査(アンケート調査を含む)

2013年現在では、東北地方も含めた29府県で発見されている。西日本を中心に定着が確認されているが、さらなる分布域拡大と定着が危惧されている。

咬傷患者については、平成26年2月17日現在、470医療機関のうち231医療機関(49.1%)から返答があった。最初の100枚の中で、クモ咬傷患者の診察を行っていたのは5医療機関、うちセアカゴケグモ咬傷患者の診察を行っていたのは1医療機関であった。今後の集計により、発生状況などが明らかになることが期待される。

6. セアカゴケグモ咬傷の詳細把握のために文献による調査

オーストラリアのセアカゴケグモについては約100例の刺咬例のうち12例が死亡した(The Aust. Mus. Leaflet, No 25, 1972)という表現から12%という高い死亡率が導かれたことが判明した。これは咬傷全体を把握していないので、このデータは今後参考とできないことが明らかとなった。さらに、オーストラリアでは1955年以降死亡者はなく(1956年に抗毒素開発)、抗毒素開発以前の死亡率は推定0.1-0.3%とされた。

7. セアカゴケグモ咬傷に対する自治体の対応を把握するための実地調査

大阪府・大阪市・福岡市ともに現在

保有している抗毒素の使用期限が2014年9月であることが判明した。

D. 考 察

1. ヤマカガシ抗毒素を用いた臨床研究

本年度は、臨床研究の枠組みの構築、倫理委員会申請、臨床研究保険の加入といった手続きを迅速に終了させたが、結果として症例を蓄積できなかった。臨床医におけるヤマカガシ咬傷の認識を高めるために、本臨床研究の啓蒙目的として、次年度は各種学会発表、誌上発表を積極的に行っていく予定である。また日本中毒センターに情報提供を行う予定としている。

2. ヤマカガシ抗毒素を用いた臨床研究を開始する以前の臨床データの把握と分析

*R. tigrinus*は線溶亢進型DICを呈する致死性疾患であるが、抗毒素の投与により効果的に治療されていたことが確認された。ヤマカガシ咬傷と診断し、DICを呈している場合には、抗毒素を速やかに投与する必要があり、原因不明の線溶更新型DICを診た場合には、ヤマカガシ咬傷を原因のひとつに考えたほうがよいと臨床医に啓蒙していくこととした。

3. ヤマカガシ抗毒素の力価試験、安定性・安全性確認、血液凝固作用中和力価試験、血管内皮細胞傷害活性阻害試験

日本のウマ抗毒素製剤はすべて

凍結乾燥品であり、有効期間は 10 年である。製造 13 年を経たヤマカガシ抗毒素が製造時と同様の安全性、力価、凝固作用中和力価を持った結果は、このヤマカガシ抗毒素も市販製剤と同じ製法で調製・凍結乾燥されたもので、その安定性から 10 年以上の品質保証が可能と予想されたが、13 年後であってもその安全性、力価、凝固作用中和力価試験においては有効性が証明された。

血管内皮細胞傷害活性阻害試験においては、ヤマカガシ試験毒素には内皮細胞傷害活性があること、さらにこのヤマカガシ内皮細胞傷害活性は、抗毒素では阻害されないことが明らかとなった。このことは、ヤマカガシ毒素の内皮細胞傷害活性の本体が抗原性が弱く抗体を誘導できないか、ほ乳類の体内で速やかに他のプロテイナーゼ等による活性化により抗原性が変化するため、抗毒素で阻害されないという可能性が考えられた。

4. セアカゴケグモ抗毒素を用いた臨床研究

本年度中のセアカゴケグモ抗毒素の本邦への輸入は再開されなかったが、災害医療センター、香川大学救命センターの両倫理委員会での承認後に臨床研究保険へ加入し、抗毒素が輸入再開され次第、臨床研究が開始できる環境を整備した。

5. セアカゴケグモ咬傷患者数把握のための調査（アンケート調査を含む）

地方自治体によるゴケグモ類の調査は系統的に行われておらず、突然大量のクモが発見される事例があることから医療関係者は、患者が咬まれた地域と今までの分布地域が一致するとは限らないことに留意すべきである。我が国の咬症患者は 3 才～86 才の広範な年齢層に認められており、10 才以下の年齢層では男児、61 才以上では女性の咬症例が多い。

アンケート調査によるプレリミナリーな結果では、多くの医療機関でクモ咬傷事例自体の診療経験がなく、クモ咬傷事例の経験無しとして報告された。残りのアンケート集計により変動する可能性があるが、クモ咬傷事例の発生は少ない可能性がある。

6. セアカゴケグモ咬傷の詳細把握のために文献による調査

セアカゴケグモ咬傷の死亡率を正確に把握することができ、冷静な対応が可能となった。オーストラリアでは 1955 年以降死亡者が発生しておらず、またそれ以前の死因については解明されていないため、さらなる検討を要する。

7. セアカゴケグモ咬傷に対する自治体の対応を把握するための実地調査

抗毒素の使用期限を 2014 年 9 月に迎えることから、その後の対応について検討を要することとなった。

E . 結論

1 . ヤマカガシ抗毒素を用いた臨

床研究

倫理委員会の承認，臨床保険の加入を経て臨床研究を平成 25 年 10 月 1 日より開始した。症例数が 0 であったため，まず第一例目を慎重に行う予定である。年間の目標数は 5 症例（軽症例を含む）である。

2. ヤマカガシ抗毒素を用いた臨床研究を開始する以前の臨床データの把握と分析

2000 年以後の 9 症例の詳細検討からヤマカガシ咬傷の病態生理が線溶亢進型 DIC であり，抗毒素が有効であることが明確となった。誌上発表し，多くの臨床医へ啓蒙する。

3. ヤマカガシ抗毒素の力価試験，安定性・安全性確認，血液凝固作用中和力価試験，血管内皮細胞傷害活性阻害試験

2000 年に研究班で製造され凍結乾燥保存されている抗毒素の品質の安全性・力価・血液凝固中和力価について確認した。

血管内皮細胞傷害活性阻害試験においては，抗毒素は血管内皮細胞傷害活性阻害を示さなかった。

4. セアカゴケグモ抗毒素を用いた臨床研究

臨床研究の枠組みの構築，倫理委員会審査，臨床研究保険の加入を経たが，セアカゴケグモ抗毒素のオーストラリア CSL 社からの輸入が中断してしまい，抗毒素の入手ができない状況となった。

セアカゴケグモ抗毒素の輸入が再開された後に直ちに臨床研究を開始する。

5. セアカゴケグモ咬傷患者数把握のための調査（アンケート調査を含む）

セアカゴケグモは国内での分布域を拡大させ，2013 年現在 29 府県で発見されており，近畿，東海，北九州地域で刺咬被害が増えてきている。

単純アンケートによりセアカゴケグモ咬傷の分布を把握し，さらに詳細アンケートを行うことにより，その臨床像を解明する予定である。

6. セアカゴケグモ咬傷の詳細把握のために文献による調査

オーストラリアでは 1955 年以降死亡者はなく（1956 年に抗毒素開発），抗毒素開発以前の死亡率においても推定 0.1-0.3%とされた。

7. セアカゴケグモ咬傷に対する自治体の対応を把握するための実地調査

抗毒素の使用期限を 2014 年 9 月に迎えることから，その後の対応について継続的に検討していく。

F . 健康危害情報

なし

G . 研究発表

1 . 論文発表
なし

2 . 学会発表

1) Hifumi T., Yamamoto A., Sakai A., Abe Y., Kawakita K., Hagiike M., Kuroda Y., Koido Y. Clinical characteristics of Yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*) bites: Results from a national survey, 2000-2013 The 14th Joint Scientific Congress of JSICM and KSCCM 2014,2,28 Kyoto

H . 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許出願
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

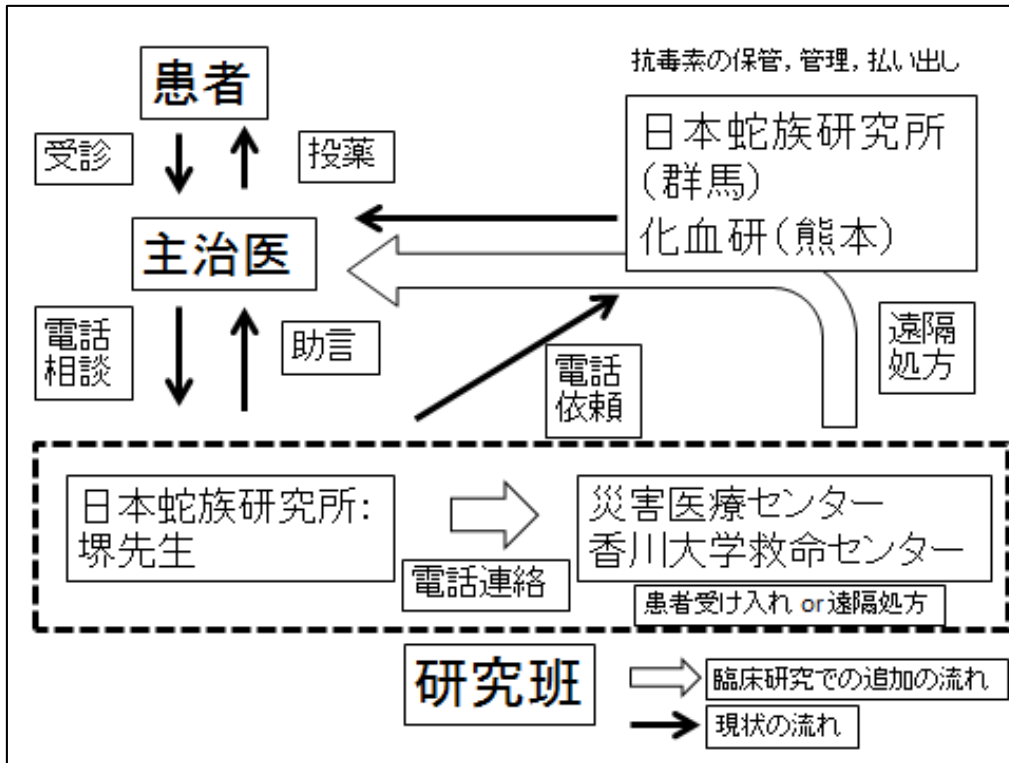


図 1 . ヤマカガシ抗毒素を用いた臨床研究の全体図

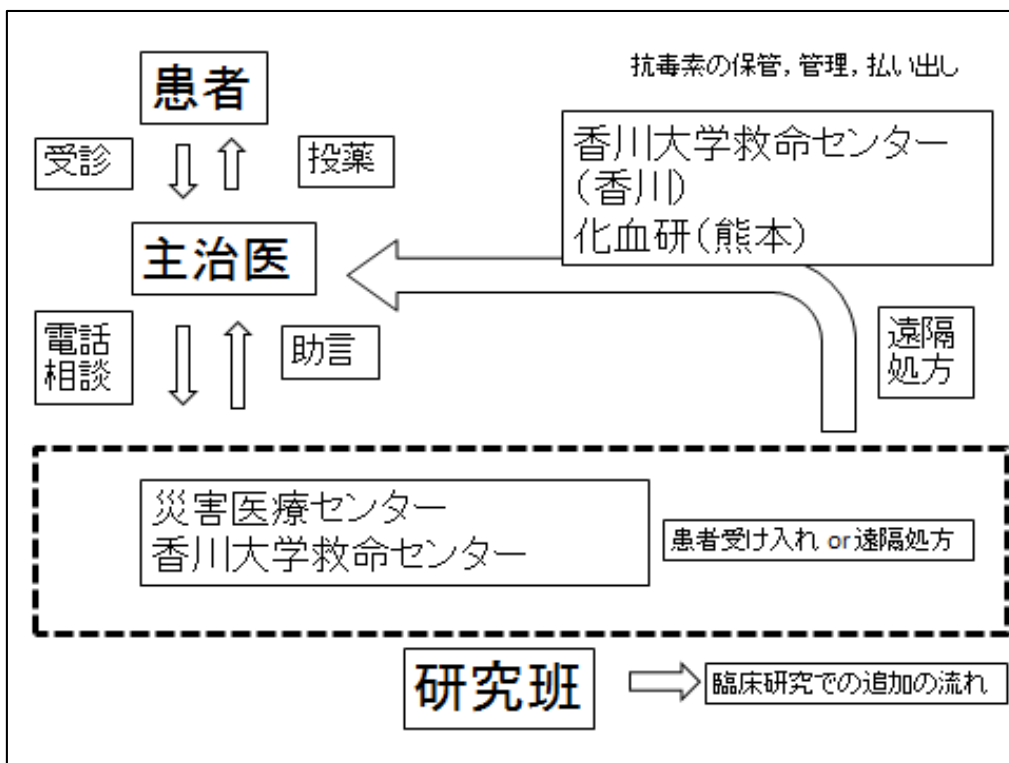


図 2 . セアカゴケグモ抗毒素を用いた臨床研究の全体図

セアカゴケグモ・ヤマカガシ抗毒素使用承諾書（同意書）

年 月 日

香川大学医学部附属病院
病院長 殿

住所： _____
患者氏名： _____ 印（男・女）
生年月日： _____ 年 月 日（ _____ 歳）
代理人署名： _____（関係 _____）
代理人署名： _____（関係 _____）

私はセアカゴケグモ・ヤマカガシ咬傷後に重篤な症状を呈しているため、厚生労働省抗毒素の品質管理及び抗毒素を使用した治療法に関する研究班からセアカゴケグモ・ヤマカガシ抗毒素の投与を受けることについて _____ 医師から下記の内容について説明を受け、理解致しましたので、この治療を受けることに同意いたします。

説明内容

1. この治療の目的と意義
2. 予想される効果と副作用
3. 他の治療法の有無とその内容
4. 同意しない場合でも今後の治療に不利益を受けないこと
5. 同意した場合でも随時これを撤回でき、今後の治療に不利益を受けないこと
6. わからない点はいつでも質問し説明を受けられること
7. プライバシーは厳重に守られること
8. 利益相反

医師記入欄

担当医師氏名（自筆）： _____ 印
病院名： _____
診療科名： _____

セアカゴケグモ・ヤマカガシ抗毒素使用承諾書（同意書）

年 月 日

抗毒素の品質管理及び抗毒素を使用した治療法に関する研究班研究代表者
香川大学附属病院救命救急センター 助教 一二三 亨 殿

住所： _____

患者氏名： _____ 印（男・女）

生年月日： _____ 年 月 日（ _____ 歳）

代理人署名： _____（関係 _____）

代理人署名： _____（関係 _____）

私はセアカゴケグモ・ヤマカガシ咬傷後に重篤な症状を呈しているため、厚生労働省抗毒素の品質管理及び抗毒素を使用した治療法に関する研究班からセアカゴケグモ・ヤマカガシ抗毒素の投与を受けることについて _____ 医師から下記の内容について説明を受け、理解致しましたので、この治療を受けることに同意いたします。

説明内容

1. この治療の目的と意義
2. 予想される効果と副作用
3. 他の治療法の有無とその内容
4. 同意しない場合でも今後の治療に不利益を受けないこと
5. 同意した場合でも随時これを撤回でき、今後の治療に不利益を受けないこと
6. わからない点はいつでも質問し説明を受けられること
7. プライバシーは厳重に守られること
8. 利益相反

医師記入欄

担当医師氏名（自筆）： _____ 印

病院名： _____

診療科名： _____

セアカゴケグモ・ヤマカガシ抗毒素使用承諾書（同意書）

年 月 日

抗毒素の品質管理及び抗毒素を使用した治療法に関する研究班班長

一三三 亨 殿

住所： _____

患者氏名： _____ 印（男・女）

生年月日： _____ 年 月 日（ _____ 歳）

代理人署名： _____（関係 _____）

私はセアカゴケグモ・ヤマカガシ咬傷後に重篤な症状を呈しているため、厚生労働省抗毒素の品質管理及び抗毒素を使用した治療法に関する研究班からセアカゴケグモ・ヤマカガシ抗毒素の投与を受けることについて _____ 医師から下記の内容について説明を受け、理解致しましたので、この治療を受けることに同意いたします。

説明内容

1. この治療の目的と意義
2. 予想される効果と副作用
3. 他の治療法の有無とその内容
4. 同意しない場合でも今後の治療に不利益を受けないこと
5. 同意した場合でも随時これを撤回でき、今後の治療に不利益を受けないこと
6. わからない点はいつでも質問し説明を受けられること
7. プライバシーは厳重に守られること

医師記入欄

担当医師氏名（自筆）： _____ 印

病院名： _____

診療科名： _____

FAX (087-891-2393)で抗毒素研究班事務局までお送りください。

抗毒素使用登録書

年 月 日

使用抗毒素	セアカゴケグモ ・ ヤマカガシ		
抗毒素使用量			
抗毒素製造番号			
主治医氏名	印	病院名・住所・電話番号	
診療科名			
患者ID			
性別	男 ・ 女		
生年月日	年 月 日		
その他			

FAX (087-891-2393)で抗毒素研究班事務局までお送りください。

抗毒素治療報告書

年 月 日

使用抗毒素	セアカゴケグモ ・ ヤマカガシ		
抗毒素使用量			
主治医氏名	印	病院名・住所・電話番号	
診療科名			
患者ID			
性別	男 ・ 女		
生年月日	年 月 日		
現病歴			
既往歴			
現症(主なもの)			
治療経過			
特殊治療の有無	人工呼吸(有、無) 血液透析(有、無) 血漿交換(有、無) 昇圧剤の使用(有、無) トロポンモジュリン(有、無) FOY(有、無)		

検査日	来院時	投与前	投与後
	年 月 日	年 月 日	年 月 日
WBC	/ μL	/ μL	/ μL
RBC	/ μL	/ μL	/ μL
Hb	g/dL	g/dL	g/dL
Hct	%	%	%
Plt	/ μL	/ μL	/ μL
FDP	μ g/mL	μ g/mL	μ g/mL
Fib	mg/dL	mg/dL	mg/dL
PT	%	%	%
APTT	sec	sec	sec
TP	g/dL	g/dL	g/dL
T-Bil	mg/dL	mg/dL	mg/dL
AST	IU/L	IU/L	IU/L
ALT	IU/L	IU/L	IU/L
LDH	IU/L	IU/L	IU/L
CK	IU/L	IU/L	IU/L
BUN	mg/dL	mg/dL	mg/dL
Cre	mg/dL	mg/dL	mg/dL
Na	mEq/L	mEq/L	mEq/L
K	mEq/L	mEq/L	mEq/L
Cl	mEq/L	mEq/L	mEq/L
CRP	mg/dL	mg/dL	mg/dL

重篤有害事象報告書			
		年 月 日	
有害事象が生じた場合には直ちに記入し、FAX (087-891-2393)で抗毒素研究班事務局までお送りください。			
主治医氏名	印	病院名・住所・電話番号	
診療科名			
患者ID			
性別	男・女		
生年月日	年 月 日		
有害事象の内容			
発生日時	年 月 日 午前・午後 時 分		
処置			
経過			
程度	軽症・中等症・重症(生命にかかわる)		
転帰	回復・軽快・死亡・後遺症 ()		
抗毒素との関連	1. 関連有り 2. 関連が否定できない 3. 関連無し 4. 不明		
その他			

様式 1

倫理審査申請書

平成 年 月 日提出

独立行政法人国立病院機構
災害医療センター院長 殿

所 属 臨床研究部
職 名 医師
申請者氏名 一二三 亨 印

災害医療センター倫理委員会規程による審査を申請します。

1 課題名 抗毒素（ヤマカガシ抗毒素、セアカゴケグモ抗毒素）の品質管理及び抗毒素を使用した治療法に関する研究	* 受付番号
2 代表者名 一二三 亨 所属 災害医療センター臨床研究部 職名 医師	
3 共同担当者名（他施設含む） 小井土雄一 災害医療センター 臨床研究部長 山本明彦 国立感染症研究所細菌第二部 主任研究官 柴山恵吾 国立感染症研究所細菌第二部・病原細菌学 部長 阿戸 学 国立感染症研究所免疫部・免疫学 部長 澤邊京子 国立感染症研究所昆虫医科学部・衛生昆虫学 部長 新井智 国立感染症研究所感染症情報センター・感染症学 主任研究官 堺淳 財団法人 日本蛇族学術研究所 主任研究員 銀永明弘 一般財団法人 化学及血清療法研究所 第一製造部 研究員	
4 概要（具体的に記載すること） (1) 目的 本臨床研究の目的は、ヤマカガシ抗毒素およびセアカゴケグモ抗毒素の安全性と有効性についての実証的データを、2000年に国立感染症研究所を中心とする厚生労働研究班によって作製された本邦4回目となるヤマカガシ抗毒素とオーストラリアより研究班担当者が個人輸入したセアカゴケグモ抗毒素を用いて、それぞれの咬傷受傷者へ投与することを通じて明らかにすることにある。	

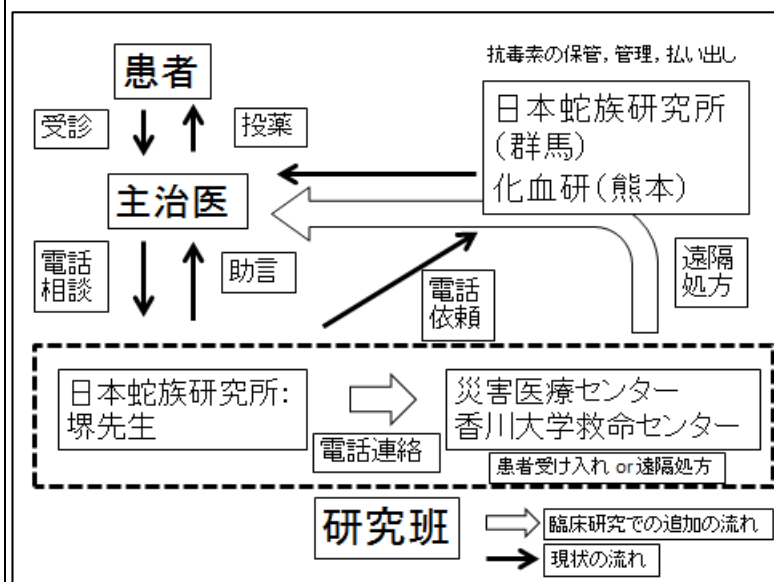
国内におけるヤマカガシ、セアカゴケグモの咬傷例は多くないため、企業は収益性の問題等から抗毒素製剤の国内開発には消極的である。しかし、それぞれの咬傷は、抗毒素治療を行わない場合は死の転帰をとることがある。ところが、現在の日本では承認薬として販売されている抗毒素は存在しない。そこで、ヤマカガシ抗毒素及びセアカゴケグモ抗毒素の有効性・安全性を評価する臨床研究を行う。これらの抗毒素は国内未承認薬であるが、ヤマカガシ、セアカゴケグモの咬傷は、抗毒素を投与しないと、重症化又は死亡する危険性があることから、本臨床研究は人道的観点からも重要である。ただ、これらの抗毒素投与による有効性と安全性については、国内のデータが大変少ないために評価ができない状況である。この目的でそれぞれの咬傷受傷者を対象に抗毒素の投与を行い、その臨床的な有効性と副反応の種類や程度など必要と考えられるデータを収集する。被験者への投与の際、抗毒素の提供と同時に患者およびその家族に十分な説明を行って、同意書を作成した上に、被験者にとって不利益になるような副反応や傷害などの事情が起きた場合は、保険で補てんする。

ヤマカガシ抗毒素は、国内ワクチン製造所（GMP対応準拠）、ヤマカガシ蛇毒研究の国内第一人者及び国家品質管理機関の研究者の知識と技術を集結して作製したものである。一方、セアカゴケグモ抗毒素は、これまでも多くの抗毒素製剤を製造してきたオーストラリアの製造所にて開発された製剤で、同国内にて頻発している同咬傷にて死者を亡くした経緯を持つ。これらの抗毒素製剤を使用した治療法の開発によって、本邦におけるヤマカガシやセアカゴケグモの咬傷に対する安全で有効な投与方法が確立し、もって国民の健康維持に有益な情報を提供できると推定される。

(2) 対象及び方法

対象：ヤマカガシやセアカゴケグモによる咬傷を受けた患者で抗毒素投与が必要と判断された患者

方法：ヤマカガシ抗毒素図1に示す。

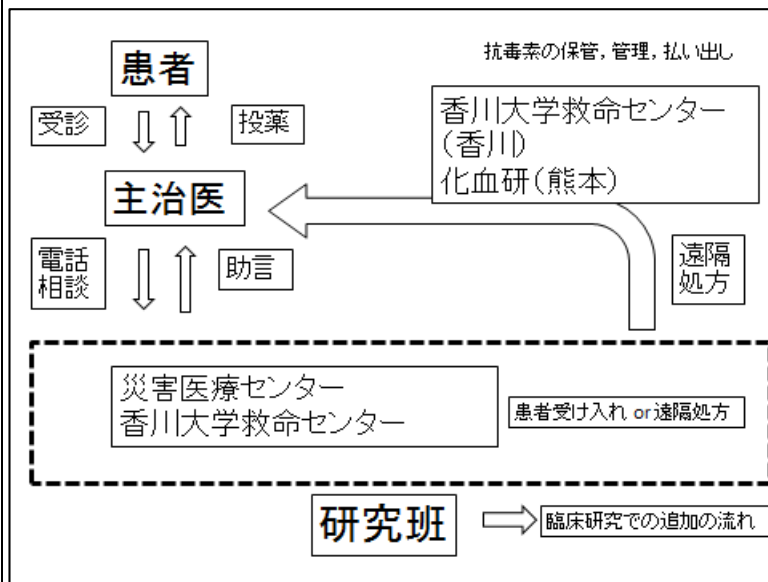


主治医から蛇咬傷などで相談を受けた日本蛇族研究所堺先生がヤマカガシ咬傷と判断し、ヤマカガシ抗毒素の投与が必要と判断した場合には研究班代表者一二三に連絡がある。その時点で、患者の状態と地理的条件を考慮し、災害医療センターないし香川大学救命センターに患者搬送が可能な場合には、転院搬送

する。不可能な場合、ないし主治医が治療の継続を望む場合には、災害医療センターないし香川大学救命センター医師が遠隔処方し、日本蛇毒研究所（群馬）ないし化学及び血清療法研究所（以下化血研とする）（熊本）から病院に抗毒素を搬送する。主治医は、本臨床研究を説明し、抗毒素使用承諾書を取得後に患者に抗毒素を投与する。

主治医は抗毒素使用登録書、治療報告書を一二三に送る。有害事象発生時には有害事象報告書を一二三まで送る。

セアカゴケグモ抗毒素については図2に示す。



主治医から電話相談をうけた研究班代表者一二三に連絡がある。その時点で、患者の状態と地理的条件を考慮し、災害医療センターないし香川大学救命センターに患者搬送が可能な場合には、転院搬送する。不可能な場合、ないし主治医が治療の継続を望む場合には、災害医療センターないし香川大学救命センター医師が遠隔処方し、香川大学救命センター（香川）ないし化血研（熊本）から病院に抗毒素を搬送する。主治医は、本臨床研究を説明し、抗毒素使用承諾書を取得後に患者に抗毒素を投与する。

主治医は抗毒素使用登録書、治療報告書を一二三に送る。有害事象発生時には有害事象報告書を一二三まで送る。

(3) 実施場所及び実施期間及び予定例数

実地場所：災害医療センター救命救急センター、香川大学救命救急センター

実地期間：倫理委員会承認後～平成28年3月31日

予想症例数：ヤマカガシ抗毒素：3-5例/年、セアカゴケグモ抗毒素：5-10例/年

(4) 審査を希望する理由 本研究は、介入を伴う臨床研究であるため、倫理委員会での審査を希望する。

<p>5 人間を直接対象とした医学的研究及び医療行為における倫理的配慮について</p> <p>(1) 医学的研究及び医療行為の対象となる個人への人権の擁護 各種情報を取扱う際は被験者の秘密保護に十分配慮する。研究成果の結果を公表する際は、被験者を特定できる情報が含まれないようにする。研究の目的以外に、本研究で得られた被験者の情報を使用しない。</p> <p>(2) 医学的研究及び医療行為の対象となる個人への利益と不利益 利益：現状では、未承認薬であるため、仮に副反応が生じても保険での適応が困難であるが、臨床研究に参加した場合には、死亡ないし重度の後遺症が生じた場合には保険にて支払が行われる。また、抗毒素の投与により全身状態が改善し、生存できる可能性が高まる。さらに今後の医療の発展に十分貢献できることが予想される。 不利益：抗毒素製剤投与により、アナフィラキシー反応の生じる可能性があるが、抗ヒスタミン剤、ステロイド、アドレナリンの前投与、または準備により十分に対応可能であると判断する。</p> <p>(3) 医学的貢献度 厚生労働省は、国内で起こりうる多くの病原体や毒物などによる疾病対策を行ってきている。しかし、国内症例が大変少ないが、重篤化すると予後が問題となる疾病については、なかなかすべてを制御することは難しい。今回の臨床研究の対象となるヤマカガシ、セアカゴケグモの咬傷受傷者の発生頻度も1年間に数例という少なさである。しかし、抗毒素がなければ重症化する危険が高く、時には死に至る危険もある。抗毒素の製造法は確立しているが、症例数の少なさのために企業は収益性の問題等から抗毒素製剤の国内開発には消極的である。そこで、過去に国内で製造された未承認薬や海外で製造される特異抗毒素製剤を用いてその臨床研究を行うことにより、これらの抗毒素の安全性と有効性および適切な治療法に関する情報が蓄積できる。この臨床研究による成果は、今後もこのような希少疾病対策へのモデルケースとなる政策効果をもたらす。 また、ヤマカガシのような毒蛇はその毒液の成分により地理的に離れた地域に生息している類似の毒蛇が存在し、特異抗毒素が製造されている場合もある。このような諸外国の抗毒素がより有効な製剤候補となり、それを治療に利用できる可能性がある。セアカゴケグモ抗毒素も輸入事例のセアカゴケグモ咬傷だけでなく、南西諸島に古来より生息する類似の毒グモ咬傷への治療法の確立が期待される。</p> <p>(4) 医学的研究及び医療行為の対象となる個人に理解を求め同意を得る方法 本研究で対象とする被験者はヤマカガシやセアカゴケグモによる咬傷を受けた患者であり、重篤な場合死に至ることがある。そのような場合の唯一の治療手段としての抗毒素の投与である。そこで、そのことを患者およびその家族に十分な説明を行ったうえで、同意書を作成し署名を得た場合にのみ被験者となる。</p>
<p>6 研究成果の公表手段 研究報告書、日本救急医学会などでの報告を予定している</p>
<p>7 経費（研究費）の項目 6,930,000円（平成25年度厚生労働科学研究費補助金（<u>新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業</u>））</p>
<p>8 主たる機関施設での倫理審査経過 なし</p>
<p>9 その他の参考事項（本課題に関連した国内外の事情、文献など）</p>

ご担当医 殿

本研究の目的:

本研究は、本臨床研究の目的は、2000年に国立感染症研究所を中心とする厚生労働研究班によって作製された本邦4回目となるヤマカガシ抗毒素と、オーストラリアより研究班担当者が個人輸入したセアカゴケグモ抗毒素を用いて、それぞれの咬傷受傷者へ投与することを通じてヤマカガシ抗毒素およびセアカゴケグモ抗毒素の安全性と有効性について評価する臨床研究です。これらの抗毒素は国内未承認薬であるが、ヤマカガシ、セアカゴケグモの咬傷は、抗毒素を投与しないと、重症化又は死亡する危険性があることから、本臨床研究は人道的観点からも重要です。

説明者の資格:

必ず主治医が行って下さい。

説明について:

添付の研究計画書および患者用説明書をよくご理解いただき、これに基づいてご説明下さい。また、当研究課題の費用負担等、利益相反についても説明して下さい。当研究は臨床研究であるため、有害事象に備え、健康被害発生時の補償等必要な措置を取って下さい(損害保険に加入する等)。抗毒素投与に際しての重篤な副作用、死亡に関する保険費用は研究班で負担致します。

同意と代諾について:

抗毒素投与対象患者ご本人に添付の「同意書」に必要事項の記入と署名をお願いしてください。

抗毒素投与対象患者が未成年もしくは何らかの理由で説明の理解と意思表示ができない場合は、その方に代わってインフォームド・コンセントを与える方(提供者の法定代理人等、提供者の意思及び利益を代弁できると考えられる方)に対し説明を行い、同意を得て下さい。

プライバシーの保護について:

同意書は主治医において保管してください。

治療報告等は必ず個人情報を削除した状態でご送付下さい。

連結可能匿名化する場合、対応表は主治医が保管して下さい。

(本研究班では、個人の特定が不可能ではあるが、提供施設では符号や番号を照合することにより、検体と提供者が特定できる。)

治療報告等の送付先および問い合わせ先:

研究計画責任者: 一二三亭

問い合わせ先:

香川大学救命救急センター 087-891-2392

医療機関各位

香川大学医学部附属病院
救命救急センター 黒田 泰弘
厚生労働科学研究費補助金 研究班
(抗毒素の品質管理及び抗毒素を使用した治療法に関する研究、研究代表者-二三号)

セアカゴケグモ咬傷に関するアンケート調査

セアカゴケグモ咬傷は、本邦では第一例が大阪で平成7年に発生し、その後全国規模で咬傷症例が報告されています。しかし、その根本治療である抗毒素は、国内承認薬はなく、オーストラリアからの個人輸入に頼らざるを得ない現状です。国内でのセアカゴケグモ咬傷についてはその詳細について調査が行われたことがないため、今回の詳細調査によりその治療法を含む臨床的特徴を明らかにすることを目的と致します。つきましては、ご多忙の折大変恐縮ですが、アンケート調査へのご協力の程何卒よろしくお願い申し上げます。

- 1 平成21年(2009年)1月1日から平成25年(2013年)12月31日までにおきまして貴施設にて加療されたセアカゴケグモ咬傷の症例数をお書きください。
セアカゴケグモ咬傷 ()例、1例以上とお答えいただいた施設に、その詳細について具体的にお伺いいたします。5例以上症例がございます場合には、後ほど直接研究班員が症例調査にお伺いしたく存じますので、症例数のみご記入ください。

2 症例

項目	症例1	症例2	症例3	症例4	症例5
受診年(例:2011年)					
年齢					
性別					
既往歴(肝硬変, DM, HD, 癌, COPD等)					
咬傷部位					

診断方法: あてはまるものに をしてください。その他は簡単に内容をご記入ください

a. セアカゴケグモをもって来た					
b. 患者がセアカゴケグモを見た					
c. 患者の申告(患者がセアカだといっている)					
d. 臨床的な判断					
e. 局所所見					
f. その他()					

来院時症状: あてはまるものに をしてください

局所疼痛					
発赤					
腫脹					
発汗					
頭痛					

来院時データ, Vital signs

収縮期血圧(mmHg)					
体温()					
WBC (/ μ L)					
Plt (万 / μ L)					
CK (IU/L)					
GOT (IU/L)					
LDH (IU/L)					

治療内容(1-6のうちあてはまるものすべて をしてください。2は簡単に内容をご記入ください。例:デブリ, 切断など)

1.鎮痛薬投与					
2.創処置(簡単に内容をご記入ください)					
3.抗生剤					
4.抗毒素投与					

抗毒素使用後の副作用

5. アナフィラキシー					
6. アナフィラキシーショック					

抗毒素の効果: あてはまるものに をしてください。その他は簡単に内容をご記入ください

疼痛緩和					
全身症状改善					
その他()					

経過 退院時転帰は軽快、転院、死亡のうちの一つを選んでください

ICU入院日数					
人工呼吸器装着日数					
入院日数					
退院時転帰(軽快、転院、死亡)					
その他の特記事項					

- 3 その他: 本研究にあたりまして、御意見ならびに御指導の程何卒よろしくお願い申し上げます

セアカゴケグモ咬傷に関する詳細アンケート調査

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

抗毒素の品質管理及び抗毒素を使用した治療法に関する研究班

分担研究報告書

抗毒素の品質管理及び抗毒素を使用した治療に関する研究

研究分担者

銀永 明弘 一般財団法人 化学及血清療法研究所 ワクチン製造一部 研究員

研究協力者

堀田 晶 一般財団法人 化学及血清療法研究所 ワクチン製造一部第二課長

堀川 義兼 一般財団法人 化学及血清療法研究所 品質管理部 菊池品質管理室長

研究要旨

現在、症状が重篤であるにも関わらずわが国では極めて稀にしか発生しない毒蛇や毒グモの咬症の対策として、いずれも抗毒素の供給体制が整備されていない。ヤマカガシ咬症に対してはわが国独自で試作製造されたヤマカガシ馬抗毒素（平成 10～11 年度厚生科学研究費補助金・厚生科学特別研究事業、倉田毅）があるが、10 年以上経過している。一方、セアカゴケグモ咬症に対しては豪州で既に製造承認されたセアカゴケグモ馬抗毒素が現在も豪州国内用に市販されている。今回、前者については冷所保存 13 年目となっているが、本研究の臨床研究として使用する目的で、事前に品質試験を行なってその安定性・安全性を確認した。その結果、品質は製造直後とほとんど変化がない成績であった（力価試験は他の分担研究者報告書参照。）。しかし、後者については豪州から抗毒素製品の入手自体が出来ず、品質確認を実施できなかった。

・ヤマカガシ抗毒素の品質管理 長期保存品の安定性確認

A．研究目的

わが国独自で試作製造されたヤマカガシ馬抗毒素（平成 10～11 年度厚生科学研究費補助金・厚生科学特別研究事業、倉田毅）は冷所に長期保存

され、平成 25 年 9 月に 13 年目となった。本研究班において臨床研究として使用する目的で、事前に品質試験を行なってその安定性・安全性を確認した。

B．研究方法

現行の生物学的製剤基準の抗毒素に関する品質試験項目と共に、近年化血研にて自家検定に加えている試験項目を実施し、本抗毒素の物理化学的性状・生物学的性状（安全性）の各品質を確認した。

（倫理面への配慮）

動物試験の実施に関しては、化血研実験動物倫理委員会の承認を受けて実施した。

C．研究結果

冷暗所に 13 年保存されたヤマカガシ馬抗毒素の品質試験の結果、製造直後の品質とほとんど変化がない成績であった。（なお、力価試験成績は他の分担研究者の報告書を参照されたい。）

D．考察

日本で市販されている馬抗毒素（ガンマグロブリン）はすべて凍結乾燥品であり、有効期間は 10 年と非常に長く保証されている。このヤマカガシ抗毒素も市販製剤と同じ製法で調製・凍結乾燥したものである。一般に、凍結乾燥されたガンマグロブリンは非常に安定性があるが、今回予想通り、10 年以上、13 年の有効性が証明された。

E．結論

13 年間保存されたヤマカガシ抗毒素の品質の安定性が確認できた。

F．健康危険情報

なし

G．研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H．知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

．セアカゴケグモ抗毒素の品質管理

当初研究計画段階では、豪州 BioCSL 社製のセアカゴケグモ馬抗毒素を従来通りの方法で入手する話を BioCSL 社と進めていた。しかしながら、その後、厚労省が正式に豪州政府に打診したところ、本製品が豪州国内用に製造しているものであるとの理由で日本への製品輸出が拒否された。そのために、当研究班での品質試験成績確認は実施できなかった。

表1. ヤマカガシ抗毒素（製造番号 0001）の長期保存安定性の確認試験成績

測定時期 試験項目	製造直後 (2000年9月)	長期保存後	
		11年5ヵ月 (2012年2月)	13年 (2013年9月)
性状確認	異常を認めず	異常を認めず	異常を認めず
不溶性異物	認めず		認めず
不溶性微粒子			0個/mL
溶解時間			185秒
浸透圧比			1.19
pH	7.13	7.18	7.12
重量偏差試験(最大偏差)	0.37%		0.65%
含湿度	0.26%	0.35%	0.48%
たん白窒素 (WF110mL復元)	4.763mgPN/mL	5.072mgPN/mL	4.870mgPN/mL
エンドトキシン	<0.004	<0.020	0.020
無菌試験	菌の発育を認めず (直接法)	菌の発育を認めず(局 方MF法)	菌の発育を認めず (局方MF法)
異常毒性否定試験 マウス モルモット	異常を認めず 異常を認めず	異常を認めず	異常を認めず
発熱(家兎3羽合計)	0.17、適合	0.11、適合	0.12、適合

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

抗毒素の品質管理及び抗毒素を使用した治療法に関する研究班

分担研究報告書

2000年に試作したヤマカガシ抗毒素のヤマカガシ毒の 血液凝固作用に対する中和力価の測定

研究分担者 堺 淳 財団法人 日本蛇族学術研究所 主任研究員

研究要旨

ヤマカガシ毒は強い血液凝固作用を示し、特にプロトロンビンを活性化することによって血液中の凝固因子を消費する。臨床的には出血傾向や血栓形成による腎系体球の閉塞を起こす。重症例ではDIC(播種性血管内凝固症候群)を起こし、急性腎不全へと進行する。1985年にウサギを、1987年にはヤギを免疫して抗毒素を試作し、11例の咬症患者に使用して顕著な治療効果を示した。2000年には厚生科研費研究班でウマを免疫して抗毒素を試作し、7例の患者で使用して同様に顕著な治療効果がみられた。しかし、このウマ抗毒素は試作してから13年が経過したため、新たに抗毒素を製造することが検討された。しかし、ヤマカガシの減少による抗原の確保が難しいことや製造コストの面などから、新たに製造することは困難である。そのため2000年に試作した抗毒素の力価を測定し、継続して使用できるかどうかを検討した。

A. 研究目的

2000年に試作製造されたヤマカガシウマ抗毒素(平成10~11年度厚生科学研究費補助金・厚生科学特別研究事業)は製造してから13年を経過したが、この抗毒素が継続して使用できるかどうかを調べる目的で、長期保存による力価の低下の有無をみるために、毒の主な作用である血液凝固作用に対する力価を測定した。

B. 研究方法

今年度はヤマカガシが入手できなかったため2000年にヤマカガシより採取した毒素を試験毒素とした。1

バイアル11.2mgが分注しており、これも13年が経過しているため血液凝固活性が保持されているかを測定し、対照として用いた。

血液凝固作用の測定は、毒溶液サンプルと塩化カルシウム溶液(25mM)に人正常血漿を加えてその凝固時間を測定し、両対数グラフに毒量と凝固時間をプロットし、その回帰直線から20秒で凝固する毒量を求めた。

次に2000年に製造したヤマカガシ毒と抗毒素を混合して37℃でインキュベートし、同様に人正常血漿を加えて凝固時間を測定した。それぞれ

れ 20 秒で凝固する毒量の差から中和量を求めた。

C . 研究結果

凝固時間の測定から、試験毒素の血液凝固活性は 13 年を経過してもほとんど低下していないことが認められた。これを対照として抗毒素と混合した後の凝固時間から中和量を求めると、1ml の抗毒素が 1.369mg、1 バイアル(10ml)が 13.69mg のヤマカガシ毒を中和する結果となった。このことから 2000 年に試作製造したヤマカガシ抗毒素は、13 年を経過しても血液凝固作用に対しては十分な力価があることがわかった。

D . 考察

ヤマカガシの毒牙や毒腺はマムシやハブとは異なっているため、直接牙から毒液を採取できない。また、摘出した毒腺から抽出しなければならぬため、非常に多くのヘビを確保しなければならない。1 匹から採取できる毒量はニホンマムシが 20mg ほどであるのに対してヤマカガシでは 5mg ほどと少ない。しかし、咬まれた時に注入される毒量はさらにその一部でかなり少ない。2000 年に製造したヤマカガシ抗毒素は現在でも十分な力価を持ち、臨床においても十分な治療効果を持つと考えられる。しかし、今後も経時的にその力価を測定しておく必要がある。

E . 結論

13 年間保存されたヤマカガシ抗毒素のヤマカガシ毒の主な作用である血液凝固作用に対して十分な力価があることが確認できた。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

抗毒素の品質管理及び抗毒素を使用した治療法に関する研究班

分担研究報告書

セアカゴケグモの分布と咬傷の実態把握

研究分担者 澤邊京子（昆虫医科学部・部長）

研究協力者 小林睦生・二瓶直子・渡辺 護（昆虫医科学部）

研究要旨

1995年9月に大阪府高石市、次いで三重県四日市市の埋立地で、これまで日本には未記録であったセアカゴケグモ (*Latrodectus hasseltii*) が発見された。その後、本種は国内での分布域を拡大させ、2013年現在で29府県で発見されている。西日本を中心に定着が確認されているが、さらなる分布域拡大と定着が危惧されていることから、今後も継続した調査と情報収集が必要である。咬症例は1995年から2013年までに80症例が公表されているが、2006年以降、近畿、東海、北九州地域を中心に明らかに増加している。我が国の咬症患者は3才から86才まで広範な年齢層に認められており、10才以下の年齢層では男児の咬症例が、61才以上では女性の咬症例が多い。これらの現状を踏まえ、各自治体は、公園、学校等の公共施設では物理的にゴケグモを取り除く積極的防除を行うことが必要である。一方、住宅地周辺においては、定期的に防除対策を行い、個体密度が高まる前の5～6月には住民参加を強力に推進し、地域全体で防除対策にあたることが推奨される。

A. 研究目的

クモの仲間は世界中で約35,000種が報告されており、多くは陸棲であるが、一部水棲のクモも知られている。日本での種類数は1,000種ほどで、多くは人に何ら危害を与えるものではなく、目立たない場所で糸を使って生活している種類が多い。我が国では、

ススキなどの葉に巣をつくるカバキコマチグモの雌成体の毒液に激しい痛みを生ずる成分が知られており、クモ刺咬症の原因として有名である。

1995年9月に大阪府高石市、次いで三重県四日市市の埋立地で、これまで日本には未記録であったセアカゴケグモ (*Latrodectus hasseltii*) (図

1) が発見された。その後、本種は国内での分布域を拡大させ、2013年現在で29府県で発見されており(図2)。特に、近畿、東海、北九州地域で刺咬被害が増えてきている。セアカゴケグモは原産地のオーストラリアでは有毒種として知られ、治療用の抗毒素血清も使用されている。国内に侵入したセアカゴケグモの刺咬被害への対応として、抗毒素血清の使用も検討しなければならない状況にある。

厚生労働省(当時は厚生省)は、1996年にセアカゴケグモ等対策専門家会議(代表 森次保雄)を開き、「外国由来の有害衛生害虫等対策に関する調査研究」報告書をまとめた。報告書には、1) 調査研究の概要、2) ゴケグモ類の分布及び生態・習性、3) ゴケグモ類の形態、4) 我が国におけるゴケグモ類の発見状況、5) ゴケグモ類の生息地調査、6) ゴケグモ類の分布拡大と定着の可能性、7) セアカゴケグモ毒腺抽出物の毒性試験及びセアカゴケグモ、ハイイロゴケグモの毒蛋白質の分析結果、8) ゴケグモ類の毒性分の質量分析による検討結果、9) ゴケグモ類に対する当面の対策(駆除対策を含む)、10) ゴケグモ咬症の症状と治療、11) ゴケグモ類の標本作製法、12) ゴケグモ以外の国内に移入された外国産有害動物の記録、13) 今後の対応について、14) ゴケグモ類文献目録、および資料の項目が設けられ、それぞれに詳細な情報が記載されている。

ここでは、セアカゴケグモの生態、

毒成分、分布域拡大、咬症、防除対策などについて、これまでに分かったことを「感染症情報」(国立感染症研究所 : <http://www.nih.go.jp/niid/ja/diseases/sa/lh.html>)を引用、新たな情報も加えて紹介する。

B. 研究方法

1. セアカゴケグモの国内での生態と分布域拡大

主に昆虫情報処理研究会が提供する「ゴケグモ類の情報センター」(<http://www.insbase.ac/xoops2/modules/bwiki/>)を利用し、本種の生態と分布域に関する情報を集計した。さらに、GIS情報を用いた解析およびSpider Diagramの作製により、大阪地区におけるセアカゴケグモの分布域拡大を解析した。

2. セアカゴケグモの毒成分

ゴケグモ類の上顎には毒腺とつながった牙がある(図3)。毒腺は、厚い筋肉層に被われており(図4)、効率良く毒液を獲物に注入する構造になっている。餌は多種類の小型の節足動物で、昆虫以外にダンゴムシなども恰好の餌となっている。この獲物に粘性の高い糸を吹きつけ、ある程度動きが治まった段階で毒液を牙から抽出した。近縁の3種ゴケグモ、アカオビゴケグモ(ヤエヤマゴケグモ)、セアカゴケグモ、ハイイロゴケグモから毒液を採取し、毒腺抽出物のSDS電気泳動パタ

ーンを比較した。次いで、市販されているジュウサンボシゴケグモ (*Latrodectus tredecimguttatus*) の -latrotoxin に対するモノクローナル抗体を前出の3種ゴケグモの毒腺抽出物由来蛋白質と反応させた。

C. 研究結果

1. セアカゴケグモの国内での生態と分布域拡大

ゴケグモは世界では30種以上が知られている。セアカゴケグモ以外では、北米ではクロゴケグモ (*L. mactans*)、ヨーロッパではジュウサンボシゴケグモ、アフリカ大陸では *L. indistinctus* などの咬症発生の頻度が高く、いずれも重要な種類である。セアカゴケグモは、主にオーストラリア大陸に分布しているが、外来種と考えられている。成体(成虫)の体長は、頭胸部と腹部を含めて雌は約1cm、雄は約0.4cmである。腹部背面に赤黄色の縦すじ模様があり、腹面にはゴケグモ全般に見られる砂時計型の特有の赤色紋がある(図1)。我が国には、セアカゴケグモ以外に、ハイイロゴケグモ、アカオビゴケグモ(ヤエヤマゴケグモ)、クロゴケグモの合計4種類の分布が確認されている。

1995年に大阪の湾岸地域で初めて確認された当時、セアカゴケグモは亜熱帯性のクモで日本では越冬できないと言われていた。しかし、セアカゴケグモが多数分布しているサウスオーストラリア州の州都アデレード市(南緯34.92°・東経138.60°)の年

平均気温16.8と、大阪市(北緯34.68・東経135.50)15.4との間に大きな差はなく、本種は温帯性のクモと考えてもよいと思われる。大阪湾岸で発見されたセアカゴケグモは、その後の数年で南北に分布域を広げ、さらに急速に内陸へと拡大した(図5)(Nihei et al., 2003)。2013年現在では、東北地方も含めた29府県で発見されている(図2)。西日本を中心に定着が確認されているが、さらなる分布域拡大と定着が危惧されているため、今後も継続した調査と情報収集が必要である。

仔グモ類の分散の様式は、仔グモが尾端から放出した糸と共に、風に乗って分散するballooningが主要な方法と考えられていた。しかし、地理情報システムを利用した分散方式の解析により作製されたSpider Diagramから、セアカゴケグモの分散方法には、仔グモが自力歩行で少しずつ分散する方法と、建築資材、自動車、自転車など何らかの運搬手段を利用して分散する方法の両方が関与していることが指摘された(Nihei et al., 2004)。実際、セアカゴケグモが多数生息している地域に見られる放置自転車(図6左)や自動車のタイヤ周辺(図6右)に多数のゴケグモの巣が確認されていること、大型商業施設の駐車場に頻度高く生息が認められる点が特徴的である。

2. セアカゴケグモの毒成分

オーストラリアのブリスベンでは、

セアカゴケグモの生息密度が非常に高く、年間数百人がゴケグモに咬まれているが、1956年にセアカゴケグモの毒成分に対する抗毒血清が市販されて以降の死亡例はほとんどない。ゴケグモ類の毒液中には遊離アミノ酸類、ヒアルロニダーゼなどの酵素類、分子量約13万のタンパク質性の神経毒（ α -latrotoxin）の存在が知られている（図7）（Hiraoka et al., 1996, Kobayashi et al., 1998）。

この毒は神経系全般にわたって働き、神経末端よりアセチルコリン、カテコールアミン等の神経伝達物質の放出を促し、再流入を阻止することにより神経末端の神経伝達物質を枯渇させる。それによって、運動神経系、自律神経系が阻害され、種々の症状が現れる。ゴケグモ類のもつ毒に対する感受性は、ネコ、ウマ、ネズミ類で高く、鳥類、両生類は低いなど、動物の種類によってかなり異なる。また、イエバエ等の昆虫類の感受性は非常に高いことも知られている。ジュウサンボシゴケグモの α -latrotoxinに対するモノクローナル抗体は、明らかにセアカゴケグモなど我が国に分布が認められる3種類のゴケグモの毒腺抽出物由来蛋白質（分子量110~120 kD領域）に反応した（図8）（Kobayashi et al., 1998）。

ゴケグモに咬まれた部位の皮膚の反応は特別強くなく、紅斑が生じない場合もあり、刺し口が1~2カ所認められる程度である。今までの報告では、咬症部位周辺の発赤、局所から拡がる

痛み、しびれ、軽度の腫脹を訴える場合が多い。オーストラリアの咬症例では、受傷後50~60分ほどで強い局所の痛みが始まり、その強さと範囲が増大していく。所属リンパ節の痛みも特徴的である。この痛みの広がり方はゆっくりでリンパ液の流れる速度とほぼ同じ程度と言われている。全身症状としては、刺咬部以外での疼痛、悪心、嘔吐、異常な発汗、倦怠、感覚異常、発熱など多彩な症状が認められている。指や腕を咬まれた場合、胸部痛が激しく起こり、心筋梗塞などの発作との鑑別が必要になる。下肢を咬まれた場合には、激しい腹痛が起こる場合があり、虫垂炎などとの鑑別が必要になる。

患者がゴケグモを持参した場合には診断が容易であるが、何に咬まれたか分からない場合には、咬まれた地域、季節（多くは6月~10月）、咬まれた状況、上記の症状の有無などを総合的に判断する必要がある。オーストラリアの例では、咬症患者の20%ほどに激しい症状が出現すると言われている。一般に、重症に陥るのは小児、高齢者、虚弱体質の者が多い。オーストラリアでは、セアカゴケグモに咬まれて抗毒素を注射された2,062名中、アナフィラキシーを起こした者はわずか11名（0.54%）で、死亡者はいなかった。11名中、5名は抗毒素の原液を静注した者である。現在、抗毒素血清を製造しているオーストラリアのCSL社は、筋肉注射を推奨している。しかし、本製品はウマ由来であるため、アナフィ

ラキシーショック対策を徹底して使用すべきである。また、頻度が低いながら注射後ある程度日数が経ってから発症する血清病に対する注意喚起も必要である。なお、生息数が少なく、分布地域が限定されているハイイロゴケグモ、八重山地方のアカオビゴケグモに対する抗毒血清は製造されていない。しかし、毒性分である - latrotoxin には上記に示したようにゴケグモ種間に共通抗原性が認められるので、上記2種の咬症患者の容体が悪化した場合には、緊急の処置としてセアカゴケグモに対する抗毒血清を使用することも選択肢の一つとして考えるべきである。

D. 考察

一般にゴケグモ類は臆病でヒトを積極的に攻撃する事はない。オーストラリアでは、毎年1,000例以上のゴケグモ咬症が報告されているが、1956年にセアカゴケグモの毒成分に対する抗毒血清が市販されてから死亡例はほとんどなくなった。我が国のセアカゴケグモの咬症例は、1995年～2013年までに大阪府を中心に80症例が公表されており、2006年以降明らかに増加している。咬症は庭に置かれたサンダル、スリッパ、長靴などを履いた、側溝の掃除をした、庭の手入れ、植木鉢やプランタを運んだなどによって咬まれた症例が多い。これは、既にセアカゴケグモが一般住宅の敷地内に入り込んでいることを示しており、今後、地域によってゴケグモの生息密度

が高まった場合、オーストラリアと同様に、家屋内に侵入する可能性が危惧されている。なお、地方自治体によるゴケグモ類の調査は系統的に行われず、突然大量のクモが発見される事例があることから、医療関係者は、患者が咬まれた地域と今までの分布地域が一致するとは限らないことに留意すべきである。我が国の咬症患者は3才～86才の広範な年齢層に認められており、10才以下の年齢層では男児、61才以上では女性の咬症例が多い。

現在、セアカゴケグモは、ハイイロゴケグモ、クロゴケグモ、ジュウサンボシゴケグモとともに特定外来生物に指定されており、環境省の許可なく生きた状態で生息場所からの移動が禁止されている。セアカゴケグモが発見された当初は、新たに造成された住宅地、大型開発地などに突然多数のゴケグモが発見される例が多く認められ、造成作業の過程で在来の天敵となりうるクモ類が一掃された後に生息域を確立すると考えられている。

各自治体は、公園、学校等の公共施設では物理的にゴケグモを取り除く防除法を中心に積極的防除が必要である。一方、住宅地周辺においては、定期的な防除対策を行い、個体密度が高まる前の5～6月に住民参加を強力に推進して、地域全体で防除対策にあたることを推奨される。

E. 結語

1. セアカゴケグモは国内での分布域を拡大させ、2013年現在で29府県で

発見されており、近畿、東海、北九州地域で刺咬被害が増えてきている。

2. 1995年～2013年までに大阪府を中心に80症例が公表されたが、2006年以降明らかな増加傾向が見られる。

3. 西日本を中心に定着が確認されているが、さらなる分布域拡大と定着が危惧されていることから、今後も継続した調査と情報収集が必要である。

4. 我が国の咬症患者は3才から86才まで広範な年齢層に認められており、10才以下の年齢層では男児の咬症例が、61才以上では女性の咬症例が多い。

5. 各自治体は、公園、学校等の公共施設では物理的にゴケグモを取り除く積極的防除を行う。一方、住宅地周

辺においては、定期的に防除対策を行い、個体密度が高まる前の5～6月には住民参加を強力に推進し、地域全体で防除対策にあたることが推奨される。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



図1 セアカゴケグモの雌成体

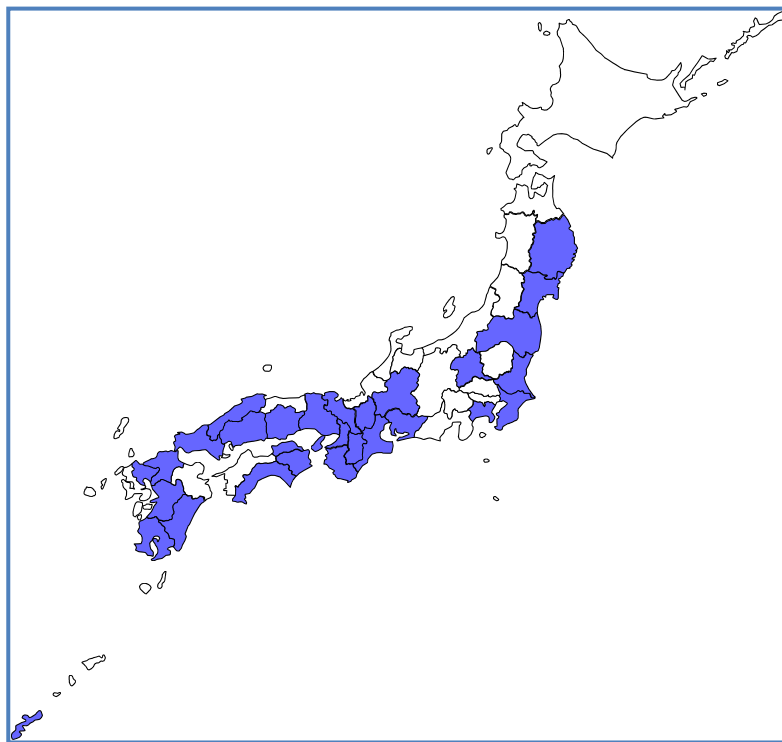


図2 我が国におけるセアカゴケグモの分布地域（2013年現在）

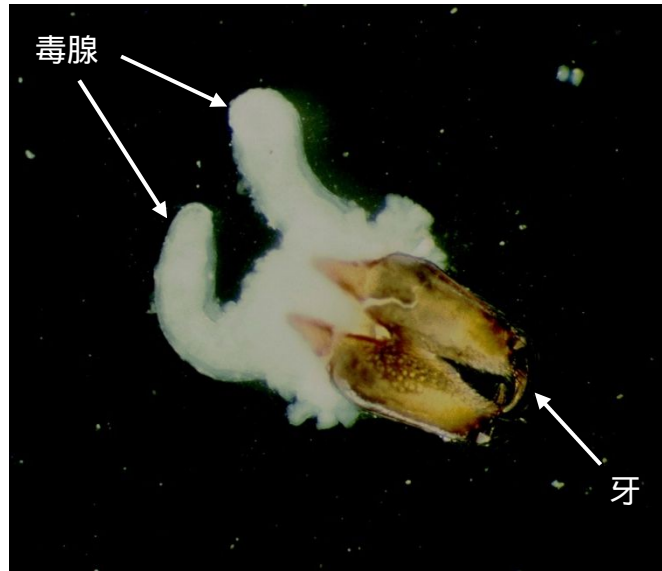


図3 セアカゴケグモの毒腺と牙（白矢印）

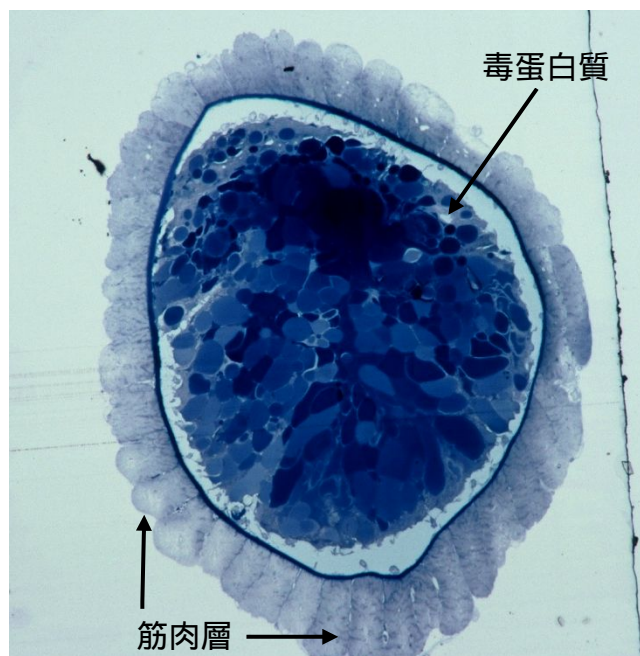


図4 セアカゴケグモ毒腺の微細構造
写真は川合覚氏（獨協医科大学国際協力支援センター）より提供

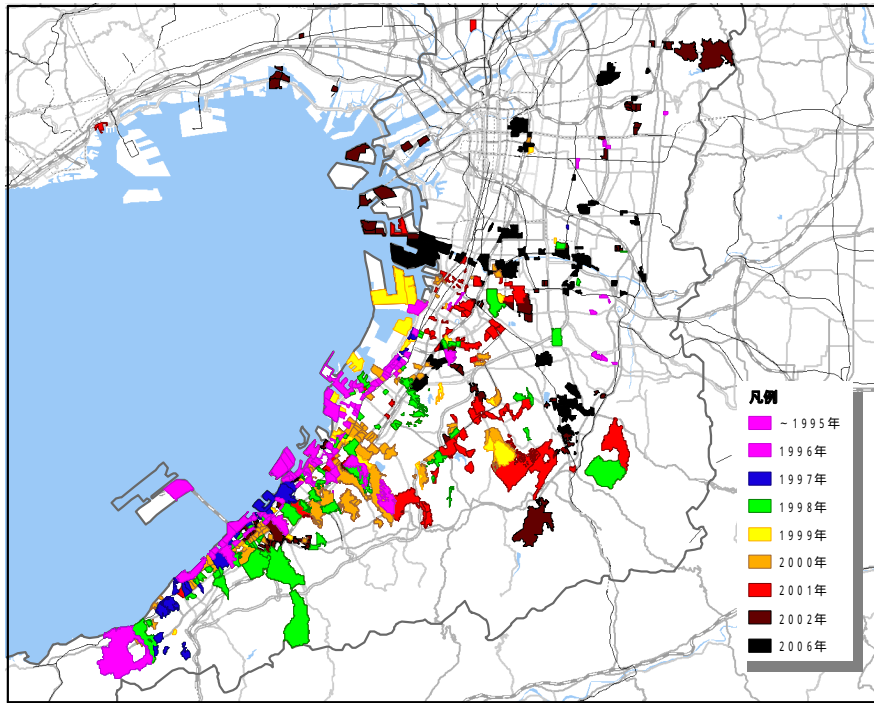


図5 大阪湾沿岸から内陸へ分布域を広げたセアカゴケグモ(1995～2006年8月)



図6 セアカゴケグモの潜み場所
 (左：放置自転車のブレーキ部分に見られる雌成体と巣，
 右：自動車のタイヤ周辺に見られるセアカゴケグモの巣)

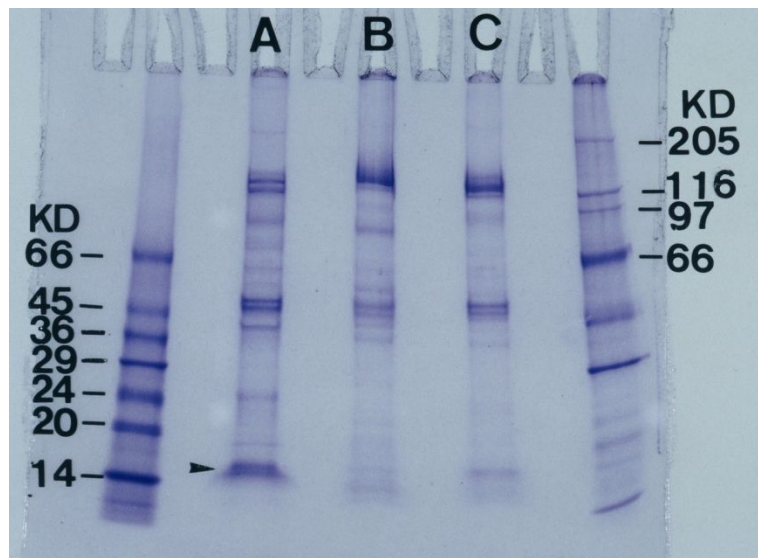


図7 3種ゴケグモの毒腺抽出物の SDS 電気泳動パターン。
 A: アカオビゴケグモ(ヤエヤマゴケグモ), B: セアカゴケグモ,
 C: ハイイロゴケグモ

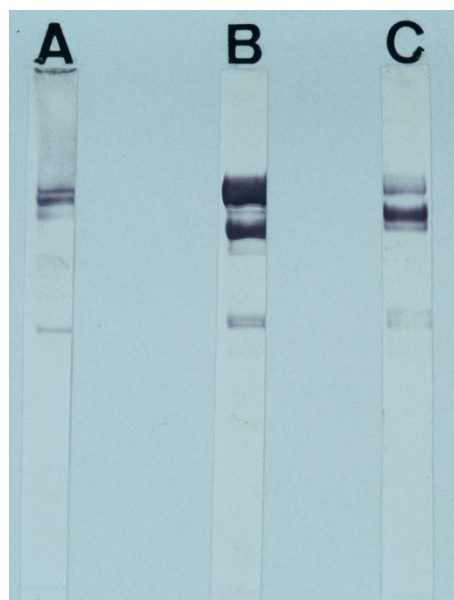


図8 3種ゴケグモの毒腺抽出物に対する抗ジュウサンボシゴケグモ-latorotoxinモノクローナル抗体の反応性。A: アカオビゴケグモ(ヤエヤマゴケグモ), B: セアカゴケグモ, C: ハイイロゴケグモ

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

抗毒素の品質管理及び抗毒素を使用した治療法に関する研究班

分担研究報告書

セアカゴケグモ咬傷患者発生状況の把握

研究分担者 新井 智 国立感染症研究所 感染症疫学センター
研究協力者 山岸拓也 国立感染症研究所 感染症疫学センター

研究要旨

セアカゴケグモは平成 7 年に国内で生息が、そして平成 9 年に国内初の咬傷事例が確認された。その後散発的に咬傷事例が報告されているが、その実態は不明である。そこで国内セアカゴケグモ咬傷事例について、医療機関へのアンケート調査による実態調査を行った。感染症発生動向調査の基幹定点医療機関 470 か所を対象に平成 26 年 2 月に実施し、2 月 17 日現在 231 通の回答があり、回答率は 49.1% (231/470) であった。2 月末まで回答を待ち、得られた結果を基に、クモ咬傷事例の地理的な偏りや、咬傷事例発生状況の把握を進める予定である。今回の調査により、今後クモ咬傷の発生状況やセアカゴケグモ咬傷事例、およびセアカゴケグモ抗血清の利用実態把握が行えると考えられる。

A 目的

平成 7 年に国内でセアカゴケグモの生息が確認されて以降、その咬傷事例の発生が危惧されてきた。その後、平成 9 年に実際に咬傷事例が確認され、国内においてもセアカゴケグモによる咬傷対策の必要性が明らかになった。その後、昆虫情報処理研究会による咬傷事例の収集が行われているものの、国内の咬傷事例の総数がどのくらいであるか不明な点多い。そこで、今回、本研究班の中で医療機関を対象

にしたアンケート調査を行い、その実態把握に努めた。

B 研究方法

アンケートを実施する前に、過去にセアカゴケグモ咬傷事例に遭遇した医療機関に事前インタビュー調査を実施した。

アンケート調査は、別紙 2 のアンケート用紙を用いた選択方式で、回答率を上げるために単純な書式とした。対象医療機関は感染症発生動向調査事業の 470 基幹定点医療機関 (平成 25 年

10月現在)を対象に実施した。なお、基幹定点医療機関は患者を300人以上収容する施設を有し、内科及び外科を標榜している病院で、2次医療圏域毎に1か所以上、地方自治体により定められている。

C 研究成果

事前インタビュー調査では、医療機関によっては毎年数例のセアカゴケグモ咬傷事例に遭遇している事実が明らかになった(別紙1参照)。事例は5月から11月の間に発生しており、クモの活動時期と関連していた。

一方アンケート調査では、アンケートの配布が平成26年1月31日であったため、最終的な集計はまだ終わっていないが、平成26年2月17日現在、470医療機関のうち231医療機関(49.1%)から返答があった。最初の100枚の中で、クモ咬傷患者の診察を行っていたのは5医療機関、うちセアカゴケグモ咬傷患者の診察を行っていたのは1医療機関であった。今後の集計により、発生状況などが明らかになることが期待される。

D 考察

アンケート前のインタビュー調査により、医療機関によっては年間数例のクモ咬傷事例に遭遇している事実が明らかになった。また、セアカゴケグモ症例として搬送された事例であっても実際にセアカゴケグモ事例と明確に明らかになっている事例は少

なく、検証が必要な事実も明らかにならなかった。

アンケート調査によるプレリミナリーな結果では、多くの医療機関でクモ咬傷事例自体の診療経験がなく、クモ咬傷事例の経験無しとして報告された。残りのアンケート集計により変動する可能性があるが、クモ咬傷事例の発生は少ない可能性がある。

E 結論

1. アンケート調査により、全国的なクモ咬傷事例の実態把握を行った。
2. 事前インタビュー調査の結果から、医療機関によっては少なくとも毎年複数の症例に遭遇していることが明らかになった(別紙1)。
3. 平成26年2月17日現在の結果では、ほとんどの医療機関でクモ咬傷の症例経験が認められなかった。

F 健康危機管理情報

なし

G 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：なし

H 知的所有権の出願・登録状況

なし

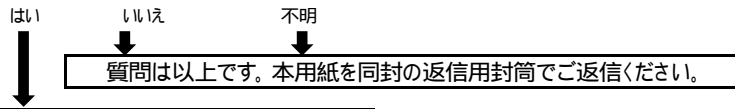
セアカゴケグモ調査票

今回は厚生労働省科学研究費補助金「抗毒素の品質管理及び抗毒素を使用した治療法に関する研究（研究代表 一三三亭）」にご協力いただきありがとうございます。本調査は国内におけるセアカゴケグモ咬傷事例の実態を把握し、対策を行っていくための調査です。

病院名 _____ 病床数 _____

回答者氏名 _____ 回答日 _____

- 1) 2011～2013年（現時点まで）にクモ咬傷の患者の診察を行いましたか？



2) ～の質問にご回答ください。

- 2) クモ咬傷、セアカゴケグモ咬傷の患者について下記の表に数字を入れて下さい。

	クモに関して 咬傷患者	セアカゴケグモに関して		
		咬傷患者数	入院患者数	死亡者数
2011年	人	人	人	人
2012年	人	人	人	人
2013年	人	人	人	人

以上です。ご協力ありがとうございました。本用紙を同封の返信用封筒でご返信ください。

国立感染症研究所感染症疫学センター 新井智、山岸拓也
FAX: 03-5285-1233, Email: seaka@niid.go.jp

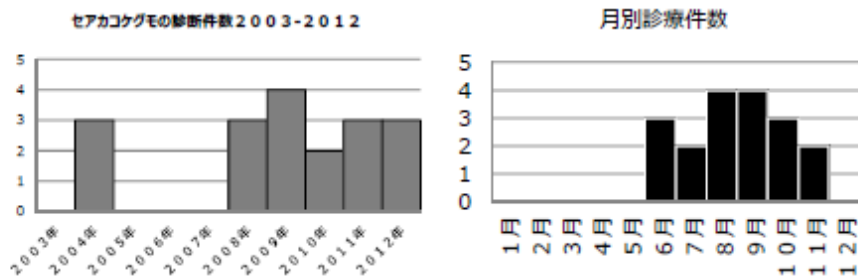
過去にセアカコケモ咬傷事例の発生した 1 医療機関に対するインタビュー調査

インタビュー方法：電話

実施日：平成 25 年 8 月 5 日

インタビュー者：国立感染症研究所 感染症疫学センター 山岸拓也

- 2003～2012 年までにクモが確認できていない疑い症例 9 人を含め 17 人が診断されていた。
- 男女比は 6:11、年齢は中央値 45 歳（四分位範囲 19-65、範囲 6-77）
- 部位は手～前腕 11、足 3、大腿 2、頸部 1
- 症状は発赤 11 例、腫脹 7 例、疼痛 14 例（N=15）
- 抗血清投与は 3 人で施行（2 人は本人の希望により施行）、すべて外来治療、1 人は不安が強くなり、アドレナリン 1mg 皮下注射
- 刺された場所は自宅内が 3 例、車内 1 例、屋外 14 例（場所の詳細は不明）



これらはセアカコケモの受傷・治療状況を示す貴重な情報だが、一医療機関のデータであり、国内の状況を表しているものではない。

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

抗毒素の品質管理及び抗毒素を使用した治療法に関する研究班

分担研究報告書

ヤマカガシ及びセアカゴケグモ抗毒素の力価試験の開発

研究分担者 阿戸 学 国立感染症研究所免疫部・部長
研究協力者 松村 隆之 国立感染症研究所免疫部・主任研究官
研究協力者 山本 明彦 国立感染症研究所細菌第二部・主任研究官

研究要旨

【背景】ヤマカガシ咬傷は、現在国内未承認薬である抗毒素を投与しなければ致死性の傷病であるが、その抗毒素の有効性・安全性について評価されていない。ヤマカガシ抗毒素の力価試験は、抗凝固活性およびマウス抗致死活性の測定によって行われている。

【目的】ヤマカガシ毒素の動物を用いない力価試験を開発するため、ヒト血管内皮細胞初代培養株を用いて、細胞傷害活性を解析し、将来的な非動物力価試験の導入を目指す。

【方法】ヒト血管内皮細胞初代培養株 HMVEC-d 細胞培養系に、ヤマカガシ毒素およびコントロールとしてハブ試験出血毒素 II を加え、MMT アッセイにより細胞傷害性解析を行った。ED100 値の毒素と希釈した抗毒素を反応させて、HMVEC-d 細胞培養系に加え、細胞傷害阻害を解析することによって、抗毒素の力価を測定した。

【結果】ハブ試験出血毒素 II の ED100 値は 2900 MHD/mL であり、ヤマカガシ毒素は ED100 値が得られなかったため、最も高い濃度である 110 LD50/mL を採用した。ハブ毒素に対する細胞傷害性は抗毒素の濃度依存的に阻害されたのに対し、ヤマカガシ毒素による細胞傷害性は、抗毒素によって阻害されなかった。

【考察・結論】ヤマカガシ毒素の内皮細胞傷害活性は、ハブ出血毒 II と比較して弱いですが、抗毒素では阻害されないことが明らかとなった。ヤマカガシ毒素の内皮細胞傷害活性は、抗毒素で阻害されないか、ほ乳類の体内で抗原性が変化する因子が内皮細胞傷害活性を示す可能性が示唆された。

A. 研究背景と目的

ヤマカガシ咬傷およびセアカゴケグモ咬傷は、抗毒素を投与しない場合、患者が死に至る場合がある。ヤマカガシ抗毒素は平成 12(2000)年に国立感染症研究所を中心として厚生労働研究班によって作製された。ヤマカガシ毒素の主たる作用は抗凝固活性であり、抗毒素の力価試験は抗凝固活性およびマウス抗致死活性の測定によって行われている。

セアカゴケグモ抗毒素はオーストラリアの CSL 社から個人輸入され使用医師の責任のもと保管・投与されている。セアカゴケグモ毒素の主成分は - ラトロトキシンであり、神経シナプスに作用し、神経伝達物質を異常放出させることによって、疼痛等の症状が生じると考えられている。

近年、動物福祉の意識が高まり、動物愛護管理法においても動物実験の国際基準である 3R(Replacement, Reduction, Refinement)が定められている。抗毒素の試験法においても、動物を使用しない力価試験の開発が社会的な要請とされつつある。本研究は、ヤマカガシ毒素の動物を用いない力価試験を開発するため、ヒト血管内皮細胞初代培養株を用いて、細胞傷害活性、および細胞接着能に及ぼす影響を解析し、将来的な非動物力価試験の導入を目指す。セアカゴケグモ抗毒素に関しては、力価測定法が開示されておらず、毒素標準品の入手が困難なことから、本年度の力価試験計画ができなかったため、平成 26 年度以降の課題となる。

B. 研究方法

1. ヒト血管内皮細胞初代培養株を用いたヤマカガシ毒素による細胞傷害性の解析

正常ヒト血管微小血管内皮細胞初代培養株(Normal Human Dermal Microvascular Endothelial Cells : HMVEC-d)細胞(Lonza 社)5000 cells/100 μ L を 96 ウェルプレートで 24 時間培養後、ヤマカガシ試験毒素、または、対照としてハブ試験毒素出血 II を、内皮細胞株培養系に加えて 4 時間培養し、MMT アッセイ(Cell Proliferation Kit (MTT):Roche 社)により、細胞生存度をマイクロプレートリーダーでの 550nm 吸光度を測定した。

2. ヤマカガシ毒素の細胞傷害性阻害作用による抗毒素力価測定

HMVEC-d 細胞 5000 cells/100 μ L を 96 ウェルプレートで 24 時間培養後、ヤマカガシ試験毒素(1100 LD50/mL)、または、対照としてハブ試験毒素出血 II (29000 MHD/mL)と、ヤマカガシ毒素、ハブ毒素それぞれに対する希釈ウマ抗血清を混和して 1 時間室温で反応させ、内皮細胞株培養系に加えて 20 時間培養し、MMT アッセイにより、細胞生存度をマイクロプレートリーダーでの 550nm 吸光度を測定することにより、抗毒素の力価を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は細胞のみを利用した実験室内での研究であり、倫理的要素を含まない。

C. 結果

1. ヒト血管内皮細胞初代培養株を用いたヤマカガシ毒素による細胞傷害性の解析

ハブ試験出血毒素 II の ED100 値は 29000 MHD/mL であり、ヤマカガシ毒素は ED100 値が得られなかったため、最

も高い濃度である 1100 LD50/mL を採用した。

2. 抗毒素の細胞傷害性阻害作用による力価測定

ハブ毒素に対する細胞傷害性は抗毒素の濃度依存的に阻害されたのに対し、ヤマカガシ毒素による細胞傷害性は、抗毒素によって阻害されなかった(図 1)。

図 1 ハブ試験毒素出血とヤマカガシ試験毒素による力価測定(単位は □1/100 □1/ウェル)

D. 考察

へビ毒素は様々な毒性をもつ多数の蛋白成分から構成されている。マムシ毒やハブ毒は、プロテイナーゼ活性に基づくフィブリノーゲン分解、トロンビン様酵素による凝固因子活性化、結合組織の分解や細胞傷害因子等によって、出血活性とともに血管透過性の亢進が起こる。これらの咬傷によって、出血傾向とともに、疼痛や浮腫といった様々な症状が生じると考えられている。

一方、ヤマカガシ毒素には強い凝固因子活性化能を認め、咬傷を受けたヒトに凝固因子の枯渇を引き起こす結果、重篤な出血傾向をおこすことがあるが、細胞傷害活性はないと考えられてきた。本研究の結果、ハブ試験出血毒 II と比較して弱いものの、ヤマカガシ試験毒素には内皮細胞傷害活性があることが明らかになった。さらに、このヤマカガシ内皮細胞傷害活性は、抗毒素では阻害されないことが明らかとなった。このことは、ヤマカガシ毒素の内皮細胞傷害活性の本体が、抗

原性が弱く抗体を誘導できないか、ほ乳類の体内で速やかに他のプロテイナーゼ等による活性化により抗原性が変化するため、抗毒素で阻害されないという可能性が考えられた。今後、これらの可能性を検証するとともに、抗毒素力価の測定が可能な、マウス致死試験に変わる細胞を用いた動物を使用しない試験法の開発を目指す。

E. 結論

ヤマカガシ毒素には内皮細胞傷害活性存在する。この内皮細胞傷害活性は、ハブ出血毒 II と比較して弱いだが、抗毒素では阻害されないことが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

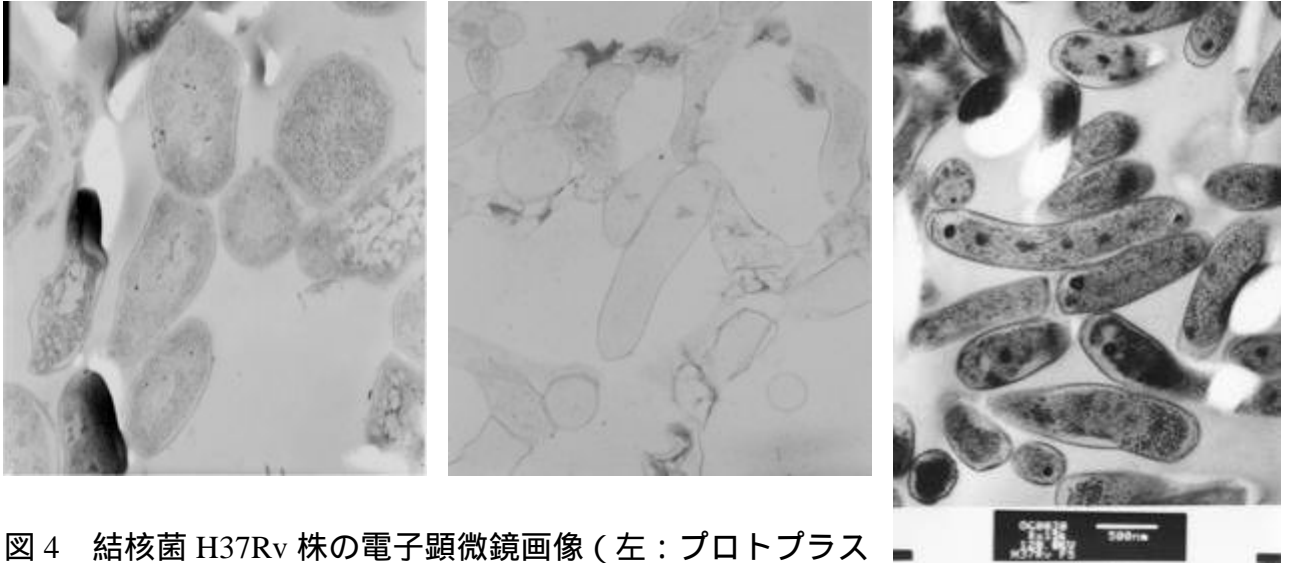


図4 結核菌 H37Rv 株の電子顕微鏡画像（左：プロトプラスト，中：長期低酸素培養 NN15，右：対数増殖期）

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

抗毒素の品質管理及び抗毒素を使用した治療法に関する研究班

分担研究報告書

ヤマカガシ及びセアカゴケグモ抗毒素の力価試験、品質管理試験

研究分担者 山本 明彦 国立感染症研究所 細菌第二部 主任研究官
研究協力者 柴山 恵吾 国立感染症研究所 細菌第二部 部長

研究要旨

ヤマカガシ抗毒素は2000年に厚生労働研究班によって作製された標品を用い、またセアカゴケグモはオーストラリアの承認薬を用いて緊急時に患者の治療をしている。本年度課題として、これらの抗毒素の力価試験として、マウス致死活性およびウサギ出血活性の中和試験を計画した。その結果、ヤマカガシ抗毒素は作製直後の13年前と同様のウサギ出血活性の中和活性を示した。セアカゴケグモ抗毒素は供給先製造所(CSL)の都合により本年度の試験は困難であった。ヤマカガシと同様の毒素活性を持つ毒蛇の抗毒素が海外で市販している新たな情報を得たため中国(上海賽倫生物技术有限公司)と南アフリカ(south africa vaccine products)の製造所と情報交換をおこなった。

.ヤマカガシ抗毒素の品質管理 力価試験

A. 研究目的

本研究班の目的は、ヤマカガシ抗毒素およびセアカゴケグモ抗毒素の安全性と有効性について、臨床研究にてその実証的データを得ることである。ヤマカガシ抗毒素は2000年に厚生労働研究班によって作製されたものをセアカゴケグモではオーストラリアの承認薬を用いての治療がなされている。分担研究課題として、これらの抗毒素の力価試験として、マウス致死

活性およびウサギ出血活性の中和能を検討した。その結果からこれらの抗毒素の有効性を示す根拠の一つとした。ヤマカガシ抗毒素は製造より13年が経過して通常のウマ抗毒素製剤の使用期限を超過したものであるために力価の減衰の可能性がある。ヤマカガシのような毒蛇はその毒液の成分により地理的に離れた地域に生息している類似の毒蛇が存在し、特異抗毒素が製造されている場合もある。このような諸外国の抗毒素がより有効な製剤候補となり、それを治療に

利用できる可能性があるので、その可能性についても調査を行った。

B. 研究方法

ヤマカガシ抗毒素は2000年に厚生労働研究班によってウマ抗毒素倒して初めて作製されたものである。一般に抗毒素の力価試験には、その中和活性を測定するための試験毒素が必要である。ヤマカガシ抗毒素はその製造時に品質管理試験用として、ヤマカガシ試験毒素が製造された。まずこの試験毒素のマウス致死活性およびウサギ出血活性の確認を行った。そのうえで、より再現性のある活性を用いて、ヤマカガシ抗毒素の力価試験を行った。

(倫理面の配慮)

力価試験として必要な動物実験については、国立感染症研究所の動物実験委員会の承認を申請し、承認を得て行った。

C. 結果

1. ヤマカガシ試験毒素活性の確認

1) マウス致死活性試験

2000年に製造されたヤマカガシ試験毒素の活性確認として、マウス致死活性を確認した。結果を表1に示す。供試試験毒素は、2200LD₅₀/vialで表記されるので、表1に示す希釈を行い1群3匹のマウスに静脈投与し2日間マウスの生死を観察した。2回の実験の結果、試験毒素投与によりマウス致死活性は認められたが、用量依存性が認められなかった。

2) ウサギ出血活性試験

ヤマカガシ試験毒素を、表2のように希釈してウサギ背部皮内に投与し24時間後の出血斑を測定した。その結果、

0.01から31.25LD₅₀の範囲で、再現性のある用量依存的な出血斑の形成が観察された。31.25LD₅₀以上の試験毒素投与では、出血斑が広がりすぎて計測が困難であり、0.01LD₅₀未満の濃度では出血斑は観察されなかった。

3) ヤマカガシ抗毒素の中和試験

1) 2)の結果より、最も安定な出血斑形成結果を示すヤマカガシ試験毒素の1および15.625LD₅₀の用量を用いてウサギ出血活性の中和活性を指標としたヤマカガシ抗毒素の力価試験を行った。表3にその結果を示す。1LD₅₀の濃度の試験毒素を用いると27倍に希釈したヤマカガシ抗毒素まで完全に出血活性を中和した。さらに81倍、243倍希釈においても25-28%の部分中和が確認された。一方、15.625LD₅₀の濃度を用いた時には、9倍に希釈したヤマカガシ抗毒素まで完全に出血活性を中和した。使用した試験毒素の濃度とヤマカガシ抗毒素の中和活性との関係を平行線定量法にて算出したところ、2.3倍の力価の違いとなり、完全中和する抗毒素の希釈濃度と近似の値を示した。

D. 考察

ヤマカガシ抗毒素(製造番号0001)の製造は、2000年の厚生労働研究班においてである。その研究報告書には、ヤマカガシ試験毒素の性質と抗毒素の中和能についての言及がある。それによると、試験毒素のマウス致死活性は、不安定であること、ウサギ出血活性は安定で、抗毒素の27倍希釈で試験毒素の完全中和がなされたとの記述がある。今回の結果は、製造当初の報告書の記載を確認する結果となった。

また、製造 13 年を経たヤマカガシ抗毒素が製造時と同様の力価活性を持った結果は、日本の馬抗毒素製剤はすべて凍結乾燥品であり、有効期間は 10 年である。このヤマカガシ抗毒素も市販製剤と同じ製法で調製・凍結乾燥されたもので、その安定性から 10 年以上の品質保証が可能と予想されたが、13 年後であってもその力価試験においては有効性が証明された。

E . 結論

13 年間保存されたヤマカガシ抗毒素のウサギ出血活性の中和活性測定による力価試験結果から、その経年変化が過小であることが確認できた。

F . 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G . 知的財産権の出願・登録状況

なし

.セアカゴケグモ抗毒素の品質管理

当初、オーストラリア BioCSL 社製のセアカゴケグモ馬抗毒素について力価試験を計画した。実際にウマ抗毒素製剤に課せられているような力価試験を行うには、試験毒素と抗毒素の中和活性の試験系の詳細が必要となる。これら試験毒素や具体的な試験方法の入手は BioCSL 社からの供与が必要なため、同社への交渉を行ったが、入手は困難が伴うことが明らかになった。初年度の研究会議でこの点を協議検討し、本製品は GMP 製剤として認められた製品であることから研究会議であらためて品質試験を実施せず、

BioCSL 社の品質試験成績書を確認する内容に計画変更となった。公開されている同社の品質試験内容についての検討では、EP に基づく品質管理試験を実施して基準を満たしていることが記載されている。今後の対応は、来年度の課題となる。

III. ヤマカガシ抗毒素の代替品の検索

2000 年に製造されたヤマカガシ抗毒素は、今年度の本分担研究においてそのウサギ出血活性の中和能において 13 年後も安定であることが確認された。しかし、今後経時変化による品質低下は否めない。第二ロットの製造が困難である現状から、他国の承認薬でヤマカガシと同様の毒素活性を持つ毒蛇に対する抗毒素製剤の輸入などの今後の体制づくりのための情報収集を行った。

まず協力研究員の高橋ら、銀永らとともに上海の訪問を行った。上海では、中国での蛇毒抗毒素製造所である上海赛伦生物技术有限公司を訪問し、その技術担当者や経営者などと意見交換を行った。特にヤマカガシ蛇毒及び抗毒素への対応について議論を行った結果、この製造所で試験的に中国生息のヤマカガシを購入し、その蛇から採毒して毒性の有無の確認することを依頼した。その後、帰国後、具体的な方法など先方に通知したが、ヤマカガシを専門に採取する業者の不在など困難がありその後の進展はない。

次に、南アフリカに生息する boomslang がヤマカガシと同様の毒性を持ち、南アフリカの south afrika vaccine products にてこの蛇の抗毒素を製造しているとの情報を得て、関係者にメールにて問い合わせを行っ

た。関係者からの返事は、この蛇の抗毒素は国内需要がひっ迫しており輸出できる状況ではないとの通知であ

った。今後、さらにヤマカガシと同様の毒蛇に対する抗毒素の情報収集に努めてゆく。

表 2. ヤマカガシ抗毒素 (製造番号 0001) の力価試験成績 (ウサギ出血活性の中和)

	test no.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Antivenom dilution	Toxin dose (LD50)	Hemalysis (mm)									
3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
81	1	14.5	17.5	16	13.5	13.5	16	15	17.5	12.5	14.5
243	1	14.5	15.5	15.5	13	19.5	18	13	17.5	16.5	13.5
3	15.625	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	15.625	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	15.625	14	15.5	12	15	12.5	13	10	11	9.5	10
81	15.625	17	17	14	17	18.5	22	16	18	13.5	14.5
243	15.625	18	19	16	14.5	20.5	25	15.5	19	14.5	14.5

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

なし

雑誌

なし